UNIVERSITÉ DE NANCY - ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE
1918-1919 2e Série N° 54

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DU

Bacillus Pyocyaneus Erythrogenes Gessard

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 24 Mai 1919, à 4 heures et demie à l'École supérieure de Pharmacie

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

(Mention Pharmacie)

PAR

M. ANDRÉ MAMELLE

Pharmacien de 1re classe

NÉ A TRAMONT-SAINT-ANDRÉ (MEURTHE-ET-MOSELLE), LE 14 OCTOBRE 1892

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. BRUNTZ . . . . . *Président.*

SARTORY . . . . . *Juges.*

HOLLANDE . . . . *Juges.*

NANCY

IMPRIMERIE LORRAINE, RIGOT ET Cie

1919

UNIVERSITÉ DE NANCY - ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE
1918-1919 2e Série N° 54

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DU

Bacillus Pyocyaneus Erythrogenes Gessard

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 24 Mai 1919, à 4 heures et demie à l'École supérieure de Pharmacie

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

(Mention Pharmacie)

PAR

M. ANDRÉ MAMELLE

Pharmacien de 1re classe

NÉ A TRAMONT-SAINT-ANDRÉ (MEURTHE-ET-MOSELLE), LE 14 OCTOBRE 1892

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. BRUNTZ . . . . . *Président.*

SARTORY . . . . . *Juges.*

HOLLANDE . . . . *Juges.*

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

NANCY

IMPRIMERIE LORRAINE, RIGOT ET Cie

1919

UNIVERSITÉ DE NANCY — ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Directeur : M. BRUNTZ, I ✪, ❁.
Assesseur : M. FAVREL, ✱, I ✪.

Professeurs :

MM.	
FAVREL, ✱, I ✪	Chimie organique.
GRELOT, ✱, I ✪	Pharmacie galénique.
BRUNTZ, I ✪, ❁	Matière médicale.
SARTORY, ✱, ✪, ❁	Pharmacie chimique.
LAVIALLE	Histoire naturelle.

Chargé de cours magistral :

DOURIS, ❁	Analyse chimique et Toxicologie.

Agrégé en exercice :

DOURIS, ❁	Chimie et Toxicologie.

Agrégé libre :

GIRARDET, I ✪	Chimie et Toxicologie.

Chargés de cours :

FAVREL, ✱, I ✪	Chimie minérale et Minéralogie.
DOURIS, ❁	Physique.
HOLLANDE	Histoire naturelle (Zoologie).
BUSQUET, ✪	Pharmacodynamie.
DOURIS, ❁	Chimie biologique.
GRELOT, ✱, I ✪	Hydrologie et Géologie.
SARTORY, ✱, ✪, ❁	Microbiologie.
VERNIER, ✪	Hygiène.
N***	Législation.

Chargé de cours libre :

SARTORY, ✱, ✪, ❁	Mycologie.

Chefs de travaux :

GIRARDET, I ✪	Chimie, Analyse chimique et Toxicologie.
HOLLANDE	Micrographie.
GILLOT	Pharmacie.
VERNIER, ✪	Microbiologie et parasitologie.
PILLOT, I ✪, chargé de travaux	Physique.

Secrétariat :

BONTEMS, I ✪	Secrétaire.
BERTRAND, I ✪	Commis.
TRIBOLET	Commis.
F. LAMBERT DES CILLEULS, ✱, ❁, I ✪	Secrétaire honoraire.

L'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les improuver.

A TOUS LES MIENS

En gage de profonde affection.

A Monsieur le Professeur BRUNTZ

Directeur de l'Ecole supérieure de Pharmacie de Nancy

A Messieurs les Professeurs
de l'École supérieure de Pharmacie de Nancy

Hommage de sincère gratitude
et de profond respect.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DU

BACILLUS PYOCYANEUS ERYTHROGENES

C. GESSARD

AVANT-PROPOS

Dès le début de 1917, je fis part de mon intention de préparer une thèse de Doctorat en Pharmacie, à M. le Professeur BRUNTZ, *Directeur de l'Ecole supérieure de Pharmacie de Nancy, qui me mit en relation avec* M. LASSEUR, *Chargé du cours de Bactériologie.*

Celui-ci m'inspira le sujet de ce travail et accepta de guider mes premières recherches. Il me remit un germe microbien, deuxième échantillon d'une variété récemment connue du Bacille pyocyanique.

J'adresse à M. BRUNTZ *l'hommage de ma profonde reconnaissance, pour l'extrême bienveillance qu'il n'a cessé de me témoigner pendant près de sept années passées à l'Ecole, et pour l'honneur qu'il me fait de bien vouloir présider la soutenance de ma thèse.*

Je prie M. LASSEUR *d'agréer l'expression de ma gratitude, pour tous les titres nombreux qu'il possède à ma*

reconnaissance. Il a suivi pas à pas mon étude, malgré le labeur considérable qu'il fournissait par ailleurs, et m'a prodigué ses conseils.

A M. le Professeur GESSARD, *de l'Institut Pasteur, dont le grand nom scientifique est intimement lié à l'étude du Bacille pyocyanique, j'exprime mes sentiments les plus vifs de déférente reconnaissance.*

Que MM. les Professeurs de l'Ecole supérieure de Pharmacie de Nancy, en particulier M. le Professeur SARTORY, *qui le premier m'a enseigné la Bactériologie, et MM. les Professeurs* FAVREL *et* LAVIALLE, *veuillent bien accepter mes sincères remerciements et mes respectueux hommages pour les enseignements et les conseils qu'ils m'ont prodigués.*

Je prie MM. les Membres du Jury et les lecteurs d'excuser les imperfections de cette thèse, en rappelant les heures pénibles, peu propres aux recherches scientifiques, vécues dans son élaboration. Ce travail fut en effet accompli tout entier à Nancy, à l'Ecole de Pharmacie, deux fois victime des bombardements.

INTRODUCTION

GESSARD qui, depuis près de quarante ans, étudie de façon magistrale le Bacille pyocyanique, avait classé jusqu'à ces derniers temps tous les échantillons connus de ce Bacille en *deux variétés*, qu'il différenciait par l'aspect des cultures sur eau peptonée :

1° La *variété pyocyanogène* ou variété normale. Le milieu cultural, où la pyocyanine bleue, prédomine sur les autres pigments, devient vert brunâtre avec le temps;

2° La *variété mélanogène*. — L'eau peptonée devient d'abord brune, puis noire, par la prédominance de la mélanine, noire.

En mai 1917, LASSEUR me remit un germe, dont les cultures sur eau peptonée rougissaient au bout de sept à huit jours. J'en poursuivais l'étude lorsque, le 24 décembre 1917, GESSARD signala l'existence d'une *troisième variété* « ÉRYTHROGÈNE » de Bacille pyocyanique, remarquable par la prédominance, dans les milieux peptonés, d'un pigment jaune verdâtre, qui devient rouge-brun par oxydation. Les caractères essentiels de cette troisième variété coïncidaient avec ceux que j'avais observés sur le germe de LASSEUR.

Gessard, auquel j'adressai un échantillon du microbe de Lasseur, confirma ma détermination d'un germe érythrogène et m'adressa un échantillon de celui qu'il possédait. Il me conseilla de « tirer parti de mon heureuse découverte », en comparant entre eux les deux échantillons connus de la nouvelle variété, et celle-ci avec la variété normale. Gessard m'engagea ensuite à « publier les particularités nouvelles et les différences que je pourrais observer ». J'expose mes résultats dans ce mémoire, divisé en six chapitres, comprenant chacun des subdivisions convenables et résumés séparément. Je termine cette thèse par des conclusions générales, dont une partie a été communiquée à la Société de Biologie, le 7 décembre 1918, par M. le Professeur Grimbert, de l'Ecole supérieure de Pharmacie de Paris. Les conclusions sont suivies d'un Index bibliographique (1) et d'une table des matières.

Après avoir résumé, dans un historique succinct, les généralités sur le Bacille pyocyanique, j'étudie successivement :

Chapitre premier

Originalité de la variété érythrogène;

Caractères différentiels : 1° avec la variété mélanogène;

2° avec la variété pyocyanogène, observés sur :

I. — Milieux non peptonés;

II. — Milieux peptonés.

(1) Remarque. — *Les dates mises entre parenthèses correspondent à l'année de publication du travail, dont le nom d'auteur est mentionné. Pour trouver les indications bibliographiques concernant les travaux cités, il faut se reporter à l'*Index *se trouvant à la fin de l'ouvrage ; les dates sont classées par ordre d'ancienneté.*

Chapitre deuxième

Caractères généraux de la variété érythrogène;

Différences présentées par les échantillons de Gessard et de Lasseur, cultivés sur :

I. — Milieux non peptonés, usuels ou spéciaux;

II. — Milieux peptonés, liquides ou solides;

III. — Milieux peptonés modifiés, glycérinés ou chlorurés.

Considérations sur le pigment jaune-verdâtre rouge.

Chapitre troisième

Propriétés de la semence;

Essais de suppression des fonctions érythrogène et pyocyanogène;

Types érythrogènes par sélection.

Chapitre quatrième

Races de la variété érythrogène, obtenues avec l'échantillon de Lasseur.

Chapitre cinquième

Généralités sur les antiseptiques;

Antiseptiques salins. Action sur le Bacille pyocyanique érythrogène.

Chapitre sixième

Sérologie : agglutination et déviation du complément, appliquées à un germe pyocyanogène et aux germes érythrogènes de Gessard et de Lasseur.

Conclusions générales.

ÉTUDE HISTORIQUE

On observe dans les services de chirurgie que le pus de certaines plaies est bleu, et colore en bleu les linges de pansement. On a découvert que ce phénomène doit être attribué à un microbe, signalé successivement par Lücke (1862), Schrœter (1872), et Eberth (1873, 1875).

Mais c'est Gessard (1882), qui a commencé vraiment l'étude du Bacille du pus bleu, qu'il a appelé *Bacillus pyocyaneus* ou Bacille pyocyanique. Le Bacille de Gessard est caractérisé essentiellement par la sécrétion d'une substance bleue : la pyocyanine, que Fordos (1869) avait fait cristalliser et dont il avait donné un procédé d'extraction.

Le Bacille pyocyanique se rattache au groupe des bactéries chromogènes, dont les produits de sécrétion sont appelés pigments ou corps colorés. L'étude du Bacille pyocyanique, faite de façon magistrale par Gessard, au point de vue du pouvoir chromogène, a également été menée à bien, dans un ordre d'idées différent, par Charrin (1889), qui, avec la découverte de la « maladie pyocyanique expérimentale », a résolu divers problèmes intéressant les microbes pathogènes.

Caractères morphologiques. — Le Bacille pyocyanique est court (1 μ à 1μ,5 sur 0μ,5) ; il se présente isolé ou en amas peu cohérents.

Si l'on cultive le Bacille pyocyanique sur des milieux auxquels on a ajouté des antiseptiques, on observe des variations morphologiques qui modifient totalement la forme microbienne normale. On retrouve la forme habituelle par transport sur milieux normaux, des germes ayant vécu en milieux antiseptisés.

Caractères généraux. — Le Bacille pyocyanique est mobile, monotriche, non sporulé. Anaérobie facultatif, il se développe à l'air, avec beaucoup plus de facilité. La température eugénésique est 37°, mais on observe encore des cultures à 15° et à 43°. Havermann (1894) a même signalé à 7° une végétation, très lente il est vrai.

Coloration. — On colore facilement avec les colorants habituels d'aniline, le Bacille pyocyanique, qui ne prend pas la coloration de Gram.

Vitalité. — Le Bacille pyocyanique, qui vit longtemps dans les milieux habituels de culture, est tué assez facilement, comme nous le verrons, par les antiseptiques : on s'explique ainsi la rareté relative de ce microbe dans les suppurations. Pourtant plusieurs médecins m'ont signalé sa présence encore fréquente dans la flore microbienne du pus des plaies de guerre. On a remarqué que les objets et produits de pansements non stérilisés (notamment le coton cardé), contribuaient à rendre extrêmement facile la propagation du Bacille pyocyanique. Quant aux compresses stérilisées, Tissier (1917) a vu qu'elles présen-

taient « de larges taches d'un beau jaune d'or, cernées d'un liséré bleu-vert ».

La pression, l'électricité, ont aussi des effets intéressants sur le pouvoir chromogène et le pouvoir toxique du Bacille pyocyanique.

Gessard a signalé que le Bacille pyocyanique pouvait être tué par chauffage à 59° pendant cinq minutes.

Pigments

Le Bacille pyocyanique sécrète quatre pigments, plus ou moins bien connus :

1° La pyocyanine (bleue);
2° Le pigment vert fluorescent;
3° Le pigment jaune verdâtre;
4° Le pigment noir.

1° Pyocyanine

Gessard (1882) a modifié le procédé d'extraction de la pyocyanine, décrit par Fordos (1869). Le principe commun aux deux procédés réside dans l'alcalinisation des cultures à l'ammoniaque, suivie de traitement au chloroforme, qui dissout surtout la pyocyanine.

D'après Gessard (1890), pour que le Bacille pyocyanique sécrète de la pyocyanine, la présence d'une source d'azote organique ou d'un sel ammoniacal est indispensable. Massi (1911) montre que le soufre et la magnésie sont également nécessaires à la production de la pyocya-

nine. Frouin et Mlle Ledebt (1912), cultivant le Bacille pyocyanique en milieu synthétique au phosphate de potasse et au sulfate de magnésie, observent un développement chromogène (1). Certaines peptones pauvres en potasse, et la gélatine à 10 %, sans bouillon ni peptone, permettent, d'après Gessard, d'obtenir la pyocyanine seule.

Charrin (1889) a constaté que, en présence de sérums d'animaux immunisés à son égard, le Bacille pyocyanique avait perdu la propriété de sécréter de la pyocyanine. Georghiewsky (1899) a confirmé ce fait.

La pyocyanine est soluble dans l'alcool faible et le chloroforme, et selon Krause (1900), insoluble dans la plupart des dissolvants organiques.

La pyocyanine possède une fonction basique, et vire au rouge sous l'influence des acides, en donnant avec eux des composés cristallisables.

Par oxydation, la pyocyanine, bleue, se transforme en une substance jaune, la pyoxanthose, susceptible de cristalliser en aiguilles.

D'après Legros (1900), la pyocyanine ne serait pas toxique, même à haute dose.

---

(1) Lasseur (1911) avait déjà vu que le magnésium était indispensable à la production de la chlororaphine et que le sulfate de magnésie donnait des résultats constants.

De même, Kuntz (1900) s'était rendu compte qu'il fallait du soufre et de la magnésie pour produire la pigmentation chez *B. prodigiosus*. Son observation fut confirmée par Samkow (1903). Enfin, Sullivan (1905) avait montré que le sulfate de magnésie était indispensable à la production des pigments rouges de *B. prodigiosus*, *B. rosaceus*, *B. metalloides*, *B. ruber balticus*, etc. .

2° Pigment vert fluorescent

Le Bacille pyocyanique sécrète, outre la pyocyanine, le pigment vert fluorescent de KUNTZ, que JORDAN (1899) a retrouvé dans plus de cinquante espèces microbiennes, voisines du Bacille pyocyanique : *B. fluorescens liquefaciens*, *B. fluorescens putridus*, etc.

JIROU (1901) et GESSARD (1902) ont établi les conditions de manifestation de la fluorescence. Celle-ci exige un apport d'azote inorganique, un hydrate de carbone et un phosphate minéral, dont la source est généralement dans les albuminoïdes. GESSARD (1892) n'a pas observé de fluorescence dans les cultures sur le milieu minéral suivant :

Succinate d'ammoniaque.	3 gr.
Sulfate de magnésie.	2 gr. 50
Eau	1.000 gr.

Le développement est peu abondant; il y a sécrétion de pyocyanine, sans mélange de vert fluorescent. Mais si on ajoute 5 gr. de phosphate de potasse, la culture devient abondante et fluorescente.

Pour GESSARD, deux doses de phosphore entrent en jeu : la première — ration d'entretien — indispensable à la vie, la seconde, productrice de fluorescence. Le Bacille pyocyanique décèlerait, d'après l'auteur, 1/8000 de phosphate de potasse, par la manifestation de sa fonction chromogène ? CATHELINEAU (1896) et LASSEUR (1911) ne trouvent pas, avec des germes chromogènes voisins, une sensibilité pareille à attribuer au phosphore. LASSEUR constate que la dose de phosphore indispensable à la culture de *B. chlororaphis*, est voisine de 15 milligrammes

de PO^4 K^2 H pour 100. A cette dose, 60 % des cultures sont fluorescentes. La fluorescence disparaît chaque fois qu'un agent quelconque diminue l'activité végétative. Après Lepierre (1895), qui met en évidence l'importance du milieu azoté, Lasseur conclut que la production de la fluorescence dépend, en dehors de la présence des phosphates, de circonstances multiples, comme la nature de l'aliment azoté, de l'aliment carboné, la proportion relative des aliments azoté, carboné et minéraux.

L'augmentation des phosphates, au delà de la quantité nécessaire pour assurer le développement normal, ne semble pas exercer sur la fluorescence une influence notable.

Les doses d'éléments nutritifs, nécessaires à la cellule pour manifester sa fonction fluorescigène, sont variables avec les semences.

On peut obtenir le pigment fluorescent seul, par culture sur albumine liquide de l'œuf.

Quant aux propriétés physico-chimiques du pigment fluorescent, je signalerai que, contrairement à la pyocyanine, il est soluble dans le chloroforme, et que si l'action des acides le fait disparaître, celle des alcalis le régénère et l'exalte; enfin que, par oxydation, il donne un pigment couleur « feuille morte ».

3° Pigment jaune verdâtre

Babès (1889) avait obtenu, après extraction de la pyocyanine d'une culture sur gélatine peptonée neutralisée, une substance rouge brun, vert émeraude à la lumière réfractée.

Gessard (1890) conclut à l'existence, dans les cultures sur certains milieux, notamment les milieux peptonés, d'un pigment jaune verdâtre, qui devient rouge brun par oxydation. L'auteur se fonde sur « la teinte de début toujours verte, de ce ton vert qu'offrait encore le bleu, bien amélioré pourtant, dans les cultures en peptone glycérinée ». Après oxydation à l'air, « c'est la teinte rougeâtre qui, s'ajoutant au bleu, donne du violet, et prédomine finalement en rouge lie de vin, par suite de la destruction complète de la pyocyanine ».

En ce qui concerne la gélose peptonée, celle-ci reste rougeâtre après traitement chloroformique, et, dans le bouillon, une « altération de même ordre fait succéder une teinte brune au vert fluorescent des premiers temps ». C'est la gélatine qui, n'étant pas colorée en jaune comme la gélose, montre le mieux, selon lui, l'existence d'un pigment nouveau, en donnant à partir de la couleur vert eau, une « franche couleur lie de vin ».

Gessard obtient même le pigment nouveau seul, par culture sur gélatine additionnée de 1 pour 100 de glucose. Le milieu donne une couleur vert jaunâtre, qui passe au brun rouge avec le temps, et dont le chloroforme n'extrait pas trace de pyocyanine.

Enfin, Gessard mentionne que la transformation par oxydation du pigment jaune verdâtre en pigment rouge brun est retardée par l'essence de moutarde ou l'essence de térébenthine. Le pigment jaune verdâtre, qu'on obtient à l'exclusion des autres pigments, ne provient donc pas, comme c'était l'opinion de Boland (1899), d'une transformation de la pyocyanine ou de la pyoxanthose.

4° Pigment noir

Gessard (1898, 1901) a signalé que la production accessoire de ce quatrième pigment est subordonnée à la présence de tyrosine dans les milieux de culture.

Le pigment noir étant assimilé au pigment de même couleur que celui produit sur la tyrosine par action de la tyrosinase, diastase oxydante, Gessard (1901) conclut que le Bacille sécrète de la tyrosinase.

Variétés du Bacille pyocyanique

On sait que Gessard classe depuis le 24 décembre 1917 les échantillons connus du Bacille pyocyanique en trois variétés : pyocyanogène, mélanogène et érythrogène, suivant la couleur des cultures sur eau peptonée.

1° Variété pyocyanogène

La variété pyocyanogène ou *normale* sécrète, sur eau peptonée à 2 %, les pigments : pyocyanine, vert fluorescent (1), jaune verdâtre. La pyocyanine prédomine en quantité sur le pigment jaune verdâtre.

Par oxydation totale, la pyocyanine donne la pyoxanthose (jaune) ; le pigment fluorescent se transforme en pigment couleur « feuille morte », et le pigment jaune verdâtre en pigment rouge brun.

L'expérience montrant que l'oxydation par l'oxygène de l'air n'est qu'incomplète, on obtient un mélange des

(1) Gessard fait usage d'une peptone fluorescente.

pigments initiaux et des pigments oxydés, dont la teinte est vert jaunâtre ou vert brunâtre.

Tel est le type de culture d'un germe pyocyanique appelé *normal*, les échantillons connus des autres variétés étant fort peu nombreux.

2° Variété mélanogène

Le type de cette variété est un Bacille isolé par Cassin d'une ulcération de la jambe, et étudié par Radais (1898). Pour montrer que le pigment d'abord rouge, puis noir, exigeait pour se produire la présence de tyrosine dans les milieux de culture, et pour faire ressortir, d'autre part, la différence entre les variétés pyocyanogène et mélanogène, Gessard employa le milieu synthétique dont il a donné la formule. Les Bacilles pyocyaniques (variété pyocyanogène et mélanogène) donnent des cultures normales, mais si, dans le milieu de Gessard, on ajoute de la tyrosine, la variété mélanogène seule donne une coloration rouge, puis brun acajou.

En bouillon peptoné, la variété mélanogène qui, au début, ne donnait pas de pyocyanine, en produit au bout d'un certain temps. Elle donne une culture rouge marron sur pomme de terre, qui noircit ensuite (bloc de cirage de Radais), tandis qu'une culture sur lait se transforme en liquide noir encre.

3° Variété érythrogène

La variété érythrogène sécrète, sur eau peptonée à 2 %, les mêmes pigments que la variété pyocyanogène (pyocyanine, vert fluorescent, jaune verdâtre).

La variété érythrogène se distingue par la prédominance du pigment jaune verdâtre sur la pyocyanine, ce qui est exactement l'inverse de ce qui se produit pour la variété pyocyanogène.

Le pigment jaune verdâtre oxydé donne un pigment rouge brun, la pyocyanine oxydée donne la pyoxanthose (jaune) : on conçoit aisément que la coloration des cultures peptonées oxydées soit rouge brun.

Les deux germes érythrogènes de GESSARD et de LASSEUR sont les seuls signalés jusqu'à ce jour. Autrefois, CHARRIN (1) avait bien observé une culture rouge en peptone, mais il ne sut à quoi attribuer ce phénomène, et ne put le reproduire. Enfin, ces derniers temps, TISSIER (1917) a entrevu au cours de ses recherches sur les microbes des plaies, l'existence d'un Bacille pyocyanique donnant des cultures rouges, mais il ne l'a pas étudié à fond et n'a pas conservé la souche.

Autres classifications

La classification de GESSARD permet bien de ranger en trois variétés tous les types connus de Bacille pyocyanique.

Comme toutes les cultures sur eau peptonée que j'ai effectuées m'ont montré de la fluorescence (GESSARD n'en a jamais vu se manifester), je ne distinguerai pas, comme JORDAN l'a fait, deux variétés, l'une pyocyanogène et fluorescigène, l'autre exclusivement pyocyanogène.

Enfin, je ne citerai que pour mémoire les types des classifications allemandes, tels que ceux de ERNST (1887)

(1) Communication personnelle de GESSARD.

α et β, de FREUDENREICH (1893) : γ, de SCHÜRMAYER (1895) : ils portent sur des différences pigmentaires trop légères, pour qu'il soit bon d'en tenir compte.

Races

Indépendamment des variétés, GESSARD (1891) distingue des races, dont je m'occuperai autre part. Ces races sont susceptibles de sécréter tel ou tel pigment, alors que d'autres, étudiées par WASSERZUG, CHARRIN et PHISALIX, sont incapables de chromogénèse.

On obtient des races par action convenable de la chaleur et des antiseptiques.

On arrive ainsi à supprimer partiellement ou totalement la sécrétion d'un pigment, de la pyocyanine par exemple. Dans la diagnose du Bacille pyocyanique, ce serait donc une erreur de se baser uniquement sur la production de la pyocyanine.

BONJEAN (1899) rend la propriété de sécréter la pyocyanine à un germe qui l'a perdue, par inoculation intrapéritonéale au cobaye, et culture du sang du cœur. Dans le même but et sans passage sur animal, on a recours au milieu réactif de GESSARD, dont la composition est la suivante :

Peptone 2, glycérine 5, gélose 5, p. 100.

CHAPITRE PREMIER

Originalité de la Variété Erythrogène

CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS

1° Avec la variété mélanogène - 2° Avec la variété pyocyanogène

Pour chaque variété de GESSARD, j'ai déjà signalé le caractère essentiel, la prédominance d'un pigment donné.

Je vais reprendre l'étude de la question en montrant que les variétés érythrogène et mélanogène sont bien différentes l'une de l'autre, malgré les colorations voisines des cultures sur eau peptonée : rouge brun pour la première variété, brune, puis noire pour la deuxième.

Le rôle primordial de la tyrosine, indispensable pour la production du pigment noir dans les cultures sur eau peptonée de la variété mélanogène, a été mis en évidence par GESSARD (1898, 1901). Il m'a paru intéressant de

cultiver la variété érythrogène sur eau peptonée additionnée de tyrosine, afin de chercher à obtenir le pigment noir, ce qui m'aurait permis d'établir, sinon une identité, du moins une parenté très proche entre les deux variétés mises en expérience.

1° Différence entre la variété érythrogène et la variété mélanogène

Comparativement, j'ai ensemencé avec la variété érythrogène :

1° De l'eau peptonée simple à 2 %, soit c, et des dilutions c/2, c/4, c/8;

2° c/2 obtenu avec un égal volume de c et d'une solution de tyrosine à 0 gr. 010 pour 100;

c/4 obtenu avec un égal volume de c/2 et d'une solution de tyrosine à 0 gr. 010 pour 100;

c/8 obtenu avec un égal volume de c/4 et d'une solution de tyrosine à 0 gr. 010 pour 100.

Les cultures ont été effectuées en ballons et en tubes à essais.

Cultures en ballons. — J'ai constaté après quarante-huit heures, que les ballons c avec tyrosine avaient une teinte verte beaucoup plus marquée que les ballons c sans tyrosine. Cette teinte verte allait en décroissant avec les dilutions peptonées.

Au bout de dix jours, les ballons c/2 avec tyrosine étaient d'un rouge très net, presque vineux, alors que ceux sans tyrosine étaient à peine rosés; les ballons c/4

avec tyrosine étaient presque rouges, alors que ceux sans tyrosine étaient roses; les ballons c/8 avec tyrosine étaient franchement roses, alors qu'avec ceux sans tyrosine, je remarquais une teinte rose à peine perceptible ou même douteuse.

Cultures en tubes. — Des phénomènes parallèles à ceux observés avec les cultures en ballons se reproduisaient avec les cultures en tubes, et au bout de dix jours, j'observais que : les tubes c/2 sans tyrosine étaient rose faible, tandis que ceux avec tyrosine étaient rouge brun; les tubes c/4 sans tyrosine étaient rose franc, avec tyrosine rose brun; les tubes c/8 sans tyrosine étaient d'un rose peu net, avec tyrosine d'un rose net.

Conclusion. — *De la présence de tyrosine surajoutée, résulte une précocité, puis un accroissement dans la sécrétion du pigment rouge, mais sans production de pigment noir, ce qui montre bien que la variété érythrogène ne possède pas la propriété spécifique de la variété mélanogène.*

2° Différence entre la variété érythrogène et la variété pyocyanogène

Pour la commodité de l'exposition, j'appellerai E le microbe de variété *érythrogène*, et PY celui de variété *pyocyanogène*.

Pour montrer la prédominance, en cultures peptonées, du pigment jaune verdâtre pour E et de la pyocyanine

pour PY, j'emploie L'EAU OXYGÉNÉE RIGOUREUSEMENT NEUTRE.

Ce procédé fait bien voir, d'une part, la *différence d'ordre quantitatif* et non qualitatif entre les deux variétés du même microbe, et démontre, d'autre part, que le phénomène du *rougissement* est un *phénomène d'oxydation.*

Je considère des cultures âgées de quatre jours de E et PY sur eau peptonée. Elles sont jaune verdâtre, le rougissement pour E ne commençant, au plus tôt, à se manifester qu'au cinquième ou sixième jour.

Je traite les cultures de E et PY par l'eau oxygénée, que j'ajoute à raison de 10 à 20 gouttes, chaque cinq minutes pendant une heure. Pour les deux variétés, le rosissement commence à s'apercevoir après dix minutes, l'oxydation totale exigeant plusieurs heures. Une solution de peptone, non ensemencée, traitée comparativement, ne rougit pas après vingt-quatre heures.

Pour E, le terme ultime de l'oxydation est le rouge vineux, pour PY, le bleu violacé.

Si j'alcalinise avec l'ammoniaque, et que je traite au chloroforme, pour extraire la pyocyanine, j'ai :

1° Une liqueur aqueuse, rouge pour E, rose très faible pour PY;

2° Une liqueur chloroformique, bleue faible pour E, très bleue pour PY.

On s'explique alors aisément que :

a) Lorsque le corps rouge disparaît sous le pigment bleu (pyocyanine), la culture se présente sous un aspect bleu violacé : c'est PY;

b) Lorsque la pyocyanine bleue disparaît sous le corps rouge, la culture a un aspect rouge violacé : c'est E.

L'oxydation du pigment jaune verdâtre, qui passe au rouge, s'opère naturellement mal pour PY, et une culture de dix jours sur eau peptonée, d'où l'on a éliminé la pyocyanine, ne montre pas toujours de teinte rose bien nette; on la fait apparaître facilement à l'eau oxygénée.

Je vais examiner comparativement les différences culturales entre E et PY, observées sur divers milieux à la température de 37°, milieux que je classerai en deux groupes :

I. — Milieux non peptonés, subdivisés eux-mêmes en :

a) Milieux usuels;

b) Milieux spéciaux.

II. — Milieux peptonés.

I. — MILIEUX NON PEPTONÉS

A. — Milieux usuels

Gélatine nutritive

Composition : bouillon solidifié par addition de gélatine.

La liquéfaction s'effectue beaucoup plus rapidement pour E que pour PY. Elle affecte, au début, la forme d'un entonnoir pour E, d'une coupe pour PY. Pour E et PY, le liquide est trouble, jaune verdâtre, très fluorescent.

Pomme de terre simple (non glycérinée)

Culture de E. — Au début, le *tubercule* prend diverses teintes : jaune grisâtre ou verdâtre, gris terreux; il atteint le jaune brun, brunit de plus en plus pour aboutir au noir.

Le *liquide* passe du jaune grisâtre ou verdâtre au rouge brun extrêmement coloré, voisin du noir (douzième jour), et devient finalement noir au vingt-cinquième jour.

Culture de PY. — Le *tubercule* passe du bleu vert au vert brunâtre (douzième jour), puis au brun noir (quinzième jour).

Le *liquide* est bleuâtre ou verdâtre, ou même prend des teintes variées.

Pigmentation. — Certains tubercules, chez les deux variétés, sont verts et révèlent la présence de la pyocyanine, alors que d'autres sont complètement privés de ce pigment.

CONCLUSION. — E donne un tubercule d'un noir intense et un liquide rouge ou noir, qu'on n'observe jamais pour PY.

POMME DE TERRE GLYCÉRINÉE

La glycérine a une influence considérable sur la sécrétion de la pyocyanine, qui donne, surtout aux liquides, une coloration bleu verdâtre intense, particulièrement appréciable avec le temps.

Pigmentation. — Certains tubercules glycérinés ne donnent pas de pyocyanine. E, au neuvième jour, donne généralement un tubercule brun noir avec pyocyanine. Avec PY, les deux tiers des tubercules ensemencés révèlent de la pyocyanine.

Observations. — L'alcalinité ou la non-alcalinité, l'âge du tuberculé ne permettent d'enregistrer aucun caractère distinctif entre E et PY.

Conclusion. — Les résultats sont les mêmes que pour les tubercules non glycérinés. Pour E, le tubercule fournit toujours une chromogènèse plus riche que pour PY. Le liquide, en ce qui concerne E, est susceptible de manifester une teinte rouge ou noire, non observée pour PY.

Bouillon

Composition : décoction pendant une demi-heure d'une partie de viande pour deux parties d'eau. Filtration. Neutralisation.

Caractère pigmentaire commun. — Pour E et pour PY, dans le liquide visqueux de culture, la présence de pigment fluorescent et de pyocyanine est constante. Pour E, la coloration ultime de la culture est le jaune brun, consécutif au jaune vert, alors que pour PY, c'est le jaune or, mêlé de vert, succédant au vert jaunâtre. Pour PY, l'éclaircissement est beaucoup plus long que pour E. Pour PY, on obtient toujours un liquide plus ou moins louche, avec dépôt floconneux, qui ne commence à s'éclaircir qu'au vingt-cinquième jour.

Conclusion. — E fournit une pigmentation plus intense que PY.

B. — Milieux spéciaux

Lait

La digestion de la caséine coagulée par E et par PY est plus rapide et plus complète pour le premier que pour le second. E est plus chromogène que PY : E sécrète davantage de pyocyanine que PY, et pour E le liquide devient à la longue jaune rougeâtre, puis plus rouge, alors que pour PY il est jaune or.

Blanc d'œuf

1° *Milieu liquide au blanc d'œuf.* — Composition : une partie de blanc d'œuf liquide pour neuf parties d'eau. Ebullition. Filtration. Stérilisation à 110°.

E, au bout de sept jours, est légèrement fluorescent, PY ne l'étant pas du tout. Pour PY, l'addition d'ammoniaque donne une fluorescence extrêmement faible, comparativement à E. Il n'y a sécrétion de pyocyanine pour aucune des deux variétés.

Conclusion. — Pour E, la fluorescence est plus intense que pour PY.

2°*Blanc d'œuf coagulé.* — J'ai conduit deux séries d'expériences, l'une :

a) Avec le blanc d'œuf baignant jusqu'à mi-hauteur dans l'eau physiologique :

Pour PY, la digestion, terminée au neuvième jour, s'effectue plus complètement que pour E. La coloration verte obtenue pour PY est beaucoup plus intense que celle obtenue pour E. E et PY ne produisent pas de pyocyanine.

L'autre :

b) En remplaçant l'eau physiologique par de l'eau peptonée :

Le blanc d'œuf est digéré complètement par PY, incomplètement par E. PY donne un liquide de digestion vert pré, beaucoup plus chromogène que celui donné par E.

Conclusion. — Dans les deux séries d'expériences, la digestion pour PY est plus complète et le liquide plus chromogène que pour E.

Milieux synthétiques Lasseur

L'intérêt de l'emploi des liquides synthétiques, composés de produits purs, est bien connu. Je n'ai pu expérimenter les milieux synthétiques d'Arnaud et Charrin, de Fraenkel et Voges et de Gessard. J'ai dû me borner aux liquides I et II de Lasseur, qui n'ont pas réagi de façon différente avec E et PY et ont donné invariablement de la pyocyanine.

II. — MILIEUX PEPTONÉS

Les milieux peptonés permettent de différencier essentiellement les deux variétés E et PY.

De même que Gessard, j'examine la peptone séparément avec ses propriétés particulières, évitant le mélange de la peptone et du bouillon, où les propriétés spécifiques de chacun des deux milieux seraient confondues.

Je considère deux catégories de milieux peptonés, permettant, toutes deux, d'établir des comparaisons intéressantes :

1° Milieux peptonés liquides;

2° Milieux peptonés solides.

1° Milieux peptonés liquides

En premier lieu, je vais examiner les caractères culturaux sur eau peptonée à 2 %. La peptone que j'ai utilisée est une peptone du commerce, qui donne en solution des cultures fluorescentes.

Gessard n'a pas observé de culture fluorescente sur eau peptonée, obtenue avec de la peptone pancréatique; c'est

même à cette particularité qu'il attribue les différences très légères rencontrées entre ses cultures et les miennes.

Eau peptonée a 2 %

Culture de PY. — PY donne le premier jour un trouble intense. Au troisième jour, à la partie supérieure du liquide se forme un voile grisâtre et fragile, et le liquide est louche, légèrement verdâtre. Au neuvième jour, cette teinte s'accentue et le voile devient gris verdâtre. Au douzième jour, le liquide est jaune vert, faiblement coloré. Au quinzième jour, il devient ensuite jaune gris ou brun très faible. Le liquide est louche et le voile est tombé. Au trentième jour, le liquide est presque limpide et jaune grisâtre.

Culture de E. — E, au troisième jour, présente un voile vert, un liquide jaune vert, qui, au sixième jour, devient vert clair, au neuvième jour, rouge brun, et au trentième jour, limpide avec une magnifique coloration rouge carmin.

Pigmentation. — Les trois pigments (fluorescent, pyocyanine et jaune verdâtre) sont sécrétés par les germes des deux variétés.

Conclusion. — Au quinzième jour de culture, E (rouge) offre une différence typique avec PY (jaune brunâtre).

Dilutions d'eau peptonée a 2 %. — J'appelle c l'eau peptonée à 2 %. J'ai préparé des dilutions c/2, c/4, c/8, c/16, c/32.

Avec E, après quinze jours de culture, c/2 donne une teinte brun marron, alors qu'avec PY, on obtient une coloration verdâtre sans trace de rose. Avec E, c/4 est vert

rosé à rose très accentué, voisin du rouge; avec PY, la couleur rose n'apparaît pas. Avec E, C/8 produit une coloration rose presque pure, avec de rares pointes verdâtres ou brunâtres; avec PY, la teinte rose est absente. Avec E, C/16 montre une teinte rose absolument pure, dont il n'y a pas trace avec PY. Avec E et PY, C/32 ne permet pas de déceler la moindre coloration, la teneur en peptone étant trop faible.

2° Milieux peptonés solides

Une émulsion de E passée sur gélose peptonée (peptone, 2 %; gélose, 3 %), en boîtes de Pétri, donne au bout de vingt-quatre heures des colorations généralement jaune verdâtre, par superposition de la coloration jaune du milieu et des colorations: bleue (de la pyocyanine), verte (du pigment fluorescent), jaune verdâtre (du pigment de ce nom).

Exceptionnellement, après vingt-quatre heures, on constate un rosissement des colonies superficielles, présentant un étalement favorable à l'oxydation.

Mais au bout de quarante-huit heures, le rougissement est constant. Les colonies profondes seules, très limitées du reste dans leur développement, ne sécrètent pas le pigment rouge.

Après quatre ou cinq jours, la puissance de sécrétion du corps rouge est maxima, donnant un magnifique aspect rouge vineux aux cultures, qui ensuite se fendillent par dessication.

PY, dans les mêmes conditions que celles signalées pour E, ne rougit pas après huit jours. A la longue néanmoins, un jaunissement assez prononcé se manifeste, mais

il exige pour se produire un temps considérable, et son intensité de coloration n'approche nullement la coloration rouge carmin des colonies érythrogènes.

La gélose peptonée en tube incliné donne lieu aux mêmes manifestations pigmentaires que la gélose peptonée en boîtes de PÉTRI.

Observation. — J'ai remarqué que PY peut sécréter abondamment de la pyocyanine, en présence d'une faible quantité de matière nutritive. Ayant cultivé PY pendant vingt-quatre heures sur gélose peptonée en grande boîte de ROUX, je prépare une émulsion avec 100 cm³ d'eau stérilisée. Cette émulsion, peu riche en matière nutritive et presque incolore, verdit de façon très intense au bout de vingt-quatre heures.

Résumé des Caractères culturaux différentiels

I. — Milieux non peptonés

La variété érythrogène semble avoir ses propriétés exaltées (pouvoir chromogène, pouvoir digestif, etc.) par rapport à la variété pyocyanogène.

II. — Milieux peptonés

Les variétés érythrogène et pyocyanogène donnent respectivement des colorations rouge carmin et jaune brun.

CHAPITRE II

Caractères généraux de la Variété érythrogène

Différences présentées par les Échantillons de Gessard et de Lasseur

LE PIGMENT ROUGE

J'apporte quelques détails sur les caractéristiques de la variété érythrogène — d'après l'échantillon de LASSEUR — et sans en faire une étude très complète, je signale ses modalités de développement sur les principaux milieux de culture. En même temps, je compare ces caractères culturaux avec ceux que donne l'échantillon de GESSARD. Ces deux échantillons étant les seuls connus jusqu'ici, il y a encore intérêt à décrire les diverses façons dont les deux nouveaux germes se comportent vis-à-vis des diffé-

rents aliments. J'apporte enfin quelques précisions sur le pigment rouge caractéristique de cette variété.

J'adopte la marche déjà employée pour la différenciation des variétés érythrogène et pyocyanogène, c'est-à-dire que je classe les milieux considérés en : 1° milieux non peptonés (subdivisés eux-mêmes en milieux usuels et milieux spéciaux), et 2° en milieux peptonés. J'appelle G le microbe de GESSARD, et L celui de LASSEUR.

I. — MILIEUX NON PEPTONÉS

A. — Milieux usuels

GÉLATINE SIMPLE A 10 % (simple solution)

On observe pour G et L un développement avec fluorescence, sans pyocyanine. G est plus limpide que L.

GÉLATINE AU BOUILLON

Pour G, la liquéfaction s'opère mieux, le liquide est plus éclairci et plus chromogène que pour L.

POMME DE TERRE NON GLYCÉRINÉE

Tubercule. — G fournit un tubercule grisâtre, terreux, qui devient jaune brun, alors que L donne un tubercule jaune grisâtre, qui devient brun rouge, puis jaune brun.

Liquide. — Le liquide pour G est trouble, achromogène. L fournit un liquide sensiblement identique.

Pigmentation. — Il n'y a pas production de pyocyanine.

CONCLUSION. — On ne peut établir vraiment de différence entre G et L, quant aux pommes de terre non glycérinées.

Pomme de terre glycérinée

Tubercule. — Pour G, au bout de quarante-huit heures, le tubercule est multicolore, et l'influence de la glycérine déjà sensible. Au bout de soixante-douze heures, il accentue ses teintes. Au cinquième jour, la chromogénèse devient de plus en plus riche (vert noir et jaune orangé), pour donner au neuvième jour un tubercule brun noir.

Pour L, après vingt-quatre heures, l'influence de la glycérine se fait sentir (le tubercule est multicolore, avec prédominance de vert). A partir du cinquième jour, la coloration s'accentue; au septième jour, le tubercule présente une pigmentation intense : vert noir à reflets métalliques, rouge orangé, rouge brun, pour aboutir, au dixième jour, à une teinte plus ou moins noire.

Liquide. — Pour G, au bout de quarante-huit heures, l'influence de la glycérine est sensible. Au cinquième jour, le liquide est vert; au septième jour, trouble et vert jaunâtre fluorescent.

Pour L, au bout de vingt-quatre heures, le liquide est faiblement vert, l'influence de la glycérine étant surtout remarquable après quarante-huit heures; au bout de cinq jours, le liquide est jaune verdâtre; au septième jour, il est vert intense fluorescent, mêlé de jaune; au dixième jour, le liquide est jaune vert intense.

Pigmentation. — Des tubercules d'âge et d'alcalinité différents ne m'ont pas montré de variations dans les propriétés chromogènes.

G et L sécrètent tous deux de la pyocyanine, et L davantage que G.

Conclusion. — La culture de L est plus chromogène que la culture de G.

Bouillon

L possède un voile à reflets métalliques, que n'a pas G. G, d'abord jaunâtre, devient jaune or. L, d'abord jaune brun, accentue peu à peu sa coloration. G est plus limpide que L et semble ainsi beaucoup plus fluorescent.

Pigmentation. — Pour G et L, on observe à la fois la présence du pigment fluorescent et de la pyocyanine.

Conclusion. — Pour G, la limpidité est plus grande et la fluorescence sensiblement plus intense que pour L, mais celui-ci est plus brun que G.

B. — Milieux spéciaux

Lait

Pour L et pour G, la coagulation est effectuée par une présure sécrétée par le Bacille. On démontre l'existence de cette présure en filtrant la culture coagulée. Le filtrat neutre est additionné d'un égal volume de lait frais, puis d'une solution à 2 % de chlorure de calcium. A 30° C., la coagulation est rapide.

Au septième jour, L a liquéfié la moitié du coagulum; au neuvième jour, les deux tiers; au douzième jour, les trois quarts (liquide opalescent, jaune verdâtre).

En surface apparaissent d'abord des taches bleues, puis jaune orangé, plus tard vertes (douzième jour).

Au cinquième jour, G a digéré le tiers du coagulum; au septième jour, les trois cinquièmes; au neuvième jour, les

quatre cinquièmes. Le liquide de digestion est jaune faible, louche, fluorescent et plus tard jaune verdâtre. En surface, on observe des colorations jaune, verte, orangée.

Pigmentation. — Pour L et pour G, on remarque, au bout de vingt-quatre heures, de la pyocyanine en surface.

CONCLUSION. — L et G sont coagulés par une présure. Au douzième jour, G a digéré davantage de caséine que L, en donnant un liquide plus vert en surface, plus jaune et plus limpide.

MILIEUX AU BLANC D'ŒUF

1° BLANC D'ŒUF LIQUIDE AU TIERS. — Composition : une partie d'albumine d'œuf pour deux parties d'eau physiologique. Le milieu est préparé aseptiquement et ensemencé directement.

Au bout de trois jours, pour L et pour G, le verdissement apparaît très faible. Au bout de cinq jours, L est vert fluorescent intense, la fluorescence semblant aussi se manifester pour G. Après sept jours, pour G elle est très faible comparativement à L.

Pigmentation. — Il ne se produit de pyocyanine ni avec G, ni avec L.

CONCLUSION. — Pour L, la fluorescence est visible au troisième jour, pour G, au quatrième ou cinquième jour. L est plus fluorescent que G.

2° BLANC D'ŒUF AU 1/10. — Préparation : une partie d'albumine d'œuf, neuf parties d'eau physiologique. Ebullition. Filtration. Stérilisation.

Pour L, au troisième jour, la teinte bleue commence à apparaître, s'accentue au cinquième jour, puis encore

davantage au septième. La partie supérieure de la culture est bleu vert intense, la partie inférieure vert pâle, le développement microbien très abondant.

Pour G, au troisième jour, on remarque une coloration verte, au cinquième jour, une fluorescence intense, avec une coloration jaune verdâtre qui s'accentue au septième jour, surtout en surface.

Si l'on traite des cultures de huit jours de L et de G par l'eau oxygénée, on a, avec L, une coloration rose intense, avec G, une coloration vert jaunâtre. Si on reprend ensuite ces cultures à l'ammoniaque, L devient jaune rosé fluorescent, et G devient vert pomme.

Pigmentation. — On remarque de la fluorescence sans pyocyanine.

Conclusion. — En faveur de G, il existe une différence de fluorescence.

3° Blanc d'œuf coagulé (baignant jusqu'à mi-hauteur dans de l'eau physiologique).

Pour L, au quatrième jour, la digestion est faible : les arêtes du cube de blanc d'œuf sont émoussées. Au septième jour, le liquide, jusqu'alors non chromogène, le devient faiblement, nettement au neuvième jour; il est louche, la digestion s'étant accentuée.

Pour G, au troisième jour, le verdissement est très faible. Au quatrième jour, la digestion débute avec un liquide légèrement verdâtre; elle s'accentue (liquide trouble), ainsi que la chromogénèse, aux septième et neuvième jours.

Pigmentation. — Pour L et pour G, on constate la présence de pyocyanine.

Conclusion. — G et L ne semblent pas offrir de caractères distinctifs marqués.

II. — MILIEUX PEPTONÉS

Je vais étudier séparément l'action des deux Bacilles érythrogènes, G et L, sur :

1° Les milieux peptonés liquides;
2° Les milieux peptonés solides;
3° Les milieux peptonés modifiés.

1° Milieux peptonés liquides

Cultures en tubes a essais de la variété érythrogène sur eau peptonée a 2 %

La culture peptonée prend d'abord une teinte jaune verdâtre, puis, de cinq à sept jours après l'ensemencement, une coloration rose commence à apparaître en surface et gagne progressivement les couches profondes, pour envahir enfin toute la masse.

Par agitation du liquide, on hâte l'oxydation du pigment jaune verdâtre, et on accélère ainsi l'apparition d'une teinte rouge uniforme. Tous les tubes de culture sur eau peptonée ne présentent pas les mêmes particularités chromogènes. Les variations de l'aération donnent au contraire des tubes bien différents les uns des autres : il n'y a pas deux tubes qui possèdent des colorations rigoureusement identiques.

Je vais mentionner ce que j'ai observé sur quinze tubes de culture ensemencés dans les mêmes conditions.

Tout d'abord, je dois signaler que les colonies isolées, qui étaient à l'origine de mes cultures liquides, avaient chacune leur pigmentation particulière et qu'une colonie verte donnait une culture jaune, alors qu'une colonie déjà rosée donnait d'abord une culture verte.

Sur une eau peptonée ensemencée depuis cinq jours, j'ai constaté une accentuation de la teinte jaune dans la partie non aérée.

Au bout de sept jours, les tubes les plus colorés étaient devenus vert brun intense, les autres vert jaune, sans rouge visible; c'est seulement le huitième jour, qu'un tube de la série considérée présentait une coloration rouge brun. Quatre tubes étaient bruns ou jaune brun, les autres plus ou moins jaune vert.

Au bout de neuf jours, huit tubes étaient brun rouge sur un centimètre de hauteur à la partie supérieure, le reste du liquide offrait une teinte jaune verdâtre. Sept tubes étaient entièrement vert jaunâtre.

Au bout de dix jours, dix tubes étaient d'un rouge brun d'accentuation variable, alors que cinq étaient d'un vert jaune, qui persistait encore au bout de quinze jours.

Au bout de seize jours, sur ces cinq tubes, trois étaient vert rosé avec des pointes brunes, les deux autres avaient toujours leur teinte jaune verdâtre. A la longue, ces deux derniers ont présenté tout au plus des pointes brunes dans leur coloration, sans jamais devenir rouges.

Comparaison entre les cultures de G et L sur eau peptonée, en tubes a essais

L possède un voile à reflets métalliques que ne possède pas G.

L, au cinquième jour, d'abord vert, devient au septième jour, jaune verdâtre ou vert rosé, puis, au huitième jour, rouge violacé, et continue jusqu'au quinzième jour à accentuer sa coloration.

G est toujours plus limpide que L, mais est moins précoce dans le rosissement ou le rougissement, et n'atteint qu'au rouge brun.

Pigmentation. — Pour L, on trouve davantage de pyocyanine que pour G.

Conclusion. — Pour L, la précocité et l'intensité du rouge sont plus grandes que pour G.

Variations dans les conditions de l'oxydation

Pour faire varier la surface d'oxydation, j'ai mis en expérience comparativement des *ballons* et des *tubes*.

Pour L, au quatrième jour, les ballons ont une coloration vert intense, très peu jaune, qui au sixième jour, passe au rouge brun. A ce moment, les tubes sont encore jaune verdâtre. La coloration rouge vineux est atteinte au onzième jour.

Pour G, au quatrième jour, les ballons sont jaune verdâtre, avec prédominance marquée du jaune; au sixième jour, ils deviennent jaune brun et, au onzième jour, rouge groseille. Pour G, la pigmentation est donc beaucoup moins forte que pour L.

Observation. — Comme dans les cultures en tubes a essais, les cultures peptonées de L en ballons ont un voile à reflets métalliques, que n'ont pas celles de G.

Conclusion. — La coloration rouge est plus intense et plus précoce dans les ballons que dans les tubes.

Action du temps

Au bout de plusieurs mois, on remarque une décoloration générale des cultures rouges.

Une culture en solution de peptone à 0 gr. 25 % a ainsi fait retour à la teinte normale du milieu avant l'ensemencement, les concentrations à 1 et 2 % ayant subi seulement un affaiblissement dans leur coloration.

Inoculation au Cobaye

Une injection intrapéritonéale d'une émulsion très riche en germes de L a été faite à un cobaye, qui est mort en quinze heures. Le sang du cœur mis en culture a donné de la pyocyanine. J'ai ensemencé avec ces cultures de l'eau peptonée à 2 %. Celle-ci n'a pas présenté de modifications dans les propriétés chromogènes habituelles, constatées avec le microbe non inoculé.

2° Milieux peptonés solides

Gélose peptonée

Composition : gélose, 3 %; peptone, 2 %.

Des germes provenant de culture sur eau peptonée servent à ensemencer de la gélose peptonée en boîtes de Pétri.

Le rougissement est fréquent après vingt-quatre heures, constant après quarante-huit heures. Il va s'accentuant jusqu'au quatrième ou cinquième jour. La plaque de gélose se dessèche ensuite.

Les passages successifs du Bacille érythrogène sur gélose peptonée atténuent rapidement la production du chromogène rouge, pour aboutir au rose faible.

J'ai toujours obtenu de la pyocyanine, qui est de présence constante et d'autant plus abondante qu'il y a davantage de pigment rouge.

Examinons maintenant, comment, sur milieu peptoné solide, se développe le corps rouge :

1° Il ne se manifeste pas avec les colonies profondes, puisqu'il n'y a pas d'oxydation;

2° Souvent une coloration rose très faible est visible après vingt-quatre heures pour une plaque de gélose ayant plusieurs milliers de colonies;

3° Les colonies primitivement les plus vertes deviennent les plus rouges;

4° Le pigment rouge diffuse autour des colonies en surface et colore d'autant plus le milieu que la colonie est plus étalée et que l'épaisseur du milieu est plus grande.

Gélose peptonée a concentration variable en gélose

La concentration variable en gélose (1, 1,5, 2, 2,5, 3 %) de la gélose peptonée n'a aucune influence sur la sécrétion du corps rouge.

Culture sur gélose peptonée dans le vide

Des tubes de gélose peptonée inclinés, sont ensemencés dans le vide ou sous pression réduite, puis scellés.

Le corps rouge ne se manifeste pas après plusieurs jours, mais si on brise les pointes des tubes, il apparaît dès le lendemain.

De même, de grandes boîtes de Pétri, renfermant de la gélose peptonée, ensemencées sur toute leur surface et inclinées, rougissent quelle que soit l'épaisseur de gélose.

Les parties recouvertes d'eau, c'est-à-dire soustraites à l'oxydation, ne rougissent pas.

Le pouvoir chromogène est très important et sa disparition enlève un élément précieux de diagnose, sur lequel insistent THIRY et LASSEUR (1913), car on ne saurait se baser uniquement sur la morphologie et l'étude cytologique qui, dans l'état actuel de nos connaissances, sont des facteurs insuffisants de détermination. La preuve en est dans l'impossibilité d'identifier certains germes ayant, pour une cause quelconque, perdu leur pouvoir chromogène. Celui-ci, moins variable que la forme et la virulence, n'en est que plus précieux.

CHARRIN et ROGER (1887) avaient déjà observé la disparition de la matière colorante avec un bacille trouvé dans l'intestin du lapin, bacille leur semblant identique à celui trouvé par KOCH et HUEPPE. Lorsque la hauteur du liquide de culture dépassait deux centimètres, il n'y avait plus de matière verte.

CHARRIN et ROGER, expérimentant avec le Bacille pyocyanique, avaient observé qu'il donne de la pyocyanine, quelle que soit la hauteur du liquide, à condition que l'apport d'air soit suffisant. Dans l'air confiné, ils n'obtinrent pas de pyocyanine, pas plus du reste que dans l'oxygène pur qui, comme l'air raréfié, permet la vie microbienne.

WASSERZUG (1887), étudiant également le Bacille pyocyanique, écrit : « C'est fort probablement à l'action plus ou moins profonde de l'oxygène, qu'il faut rapporter en grande partie toutes les causes qui modifient la fonction chromogène. » Il ajoute que « le Bacille est capable de vivre à l'abri de l'air sans donner de matière colorante »,

3° Milieux peptonés modifiés

a) par addition de glycérine;

b) par addition de chlorure de sodium.

a) Peptone glycérinée. — Composition : eau peptonée, 2 %; glycérine, 5 %.

Mazzei (1907), expérimentant en culture glycérinée, avec sept microbes chromogènes, a constaté que la pigmentation pouvait être diminuée, retardée, ou même abolie; au contraire, la glycérine donne, comme nous l'avons déjà observé, des résultats importants dans l'exaltation de la chromogénèse, en ce qui concerne le Bacille pyocyanique.

Examinons l'aspect d'une culture de L sur peptone glycérinée, comparativement avec une culture sur peptone simple.

Au bout de deux jours, on semble observer une pigmentation, moins intense en peptone glycérinée, qu'en peptone simple. Mais après sept jours, la glycérine exalte la coloration verte et la limpidité; on ne remarque pas la moindre coloration rouge, déjà visible, par contre, en milieu non glycériné. Au bout de neuf jours, la peptone glycérinée est vert intense, la peptone simple plus ou moins rouge brun, et cette différence ne fait que s'accentuer.

Pigmentation. — Il y a beaucoup plus de pyocyanine en peptone glycérinée qu'en peptone simple.

Conclusion. — La glycérine exagère tellement la production de la pyocyanine, que celle-ci masque le corps rouge, et donne à la culture une coloration vert intense En même temps, la glycérine accroît la limpidité.

G se comporte comme L, mais en sécrétant moins de pyocyanine et de pigment rouge.

b) Peptone salée. — Composition : peptone, 2 gr.; NaCl, 6-7 gr.; eau, 100 gr.

Sperlich (1912) constate l'influence du chlorure de sodium dans l'augmentation des productions pigmentaires. Il signale notamment que les sécrétions de très nombreuses bactéries à pigments rouges (ex. *Sarcina lutea*), sont favorisées par addition de chlorure de sodium au milieu cultural.

Cultivant L sur peptone salée, j'obtiens un développement microbien caractérisé par un trouble intense. La culture présente une teinte grisâtre, exempte de tout pigment, ce qui confirme du reste les observations que Wasserzug avait faites en 1887. Mais cette culture achromogène donne lieu à un phénomène curieux, analogue à celui observé par Sperlich.

Les germes ayant vécu et s'étant développés en milieu salin, transportés ensuite sur milieux peptonés normaux, possèdent un pouvoir érythrogène très accru. C'est ainsi que des germes étant demeurés pendant un mois en peptone salée, passés ou 1° sur gélose peptonée en plaques et en tubes inclinés, donnent des colonies d'un rouge vif particulièrement intense, qui repiquées sur gélose peptonée, donnent à nouveau la coloration rouge carmin, ou 2° sur eau peptonée, fournissent des cultures dont le pouvoir érythrogène est augmenté.

Par passages successifs des Bacilles sur ces milieux normaux, on observe ensuite une atténuation dans la production du pigment rouge.

Mais l'exaltation dans la production du pigment rouge n'est sans doute qu'un phénomène temporaire, ne se produisant qu'au début du contact entre les germes et le chlorure de sodium, car le cycle Peptone salée (cinq jours), Gélose peptonée en boîte de PÉTRI (quatre jours), Peptone salée (cinq jours), renouvelé deux fois, donne naissance à des générations accoutumées au sel : au lieu d'un accroissement continu de la coloration rouge, on n'observe plus qu'une vague teinte rosée. Il en est de même si l'on effectue quatre cultures consécutives de cinq jours en peptone salée, qui ne donnent plus qu'une coloration rose faible sur gélose peptonée en boîte de PÉTRI.

Observation. — Les colonies rouge carmin, obtenues à partir d'une culture en peptone salée, renferment toujours et en grande abondance de la pyocyanine.

CONCLUSION. — Le Bacille érythrogène, cultivé sur eau peptonée salée à 6 et 7 %, se multiplie en donnant les premières générations au pouvoir érythrogène exalté.

Considérations sur le Pigment jaune verdâtre-rouge

Le Bacille pyocyanique érythrogène ne saurait être rapproché du nouveau bacille isolé par LASSEUR, de l'eau de Laître-sous-Amance, bien que tous deux produisent des colorations rouges ayant sensiblement le même aspect. Les deux bactéries sont, selon LASSEUR (1), absolument différentes, et les chromogènes produits n'ont de commun qu'une coloration voisine.

Une culture de *B. chlororaphis,* traitée par LASSEUR

(1) Communication orale.

(1911), au zinc et à l'acide chlorhydrique, donne une teinte verte. Après avoir filtré et fractionné le filtrat, l'auteur le soumit à des modes d'oxydation variés. Quand une coloration apparut, elle varia du rose au rouge vineux.

Propriétés physico-chimiques du corps rouge

Les propriétés physico-chimiques du corps rouge, non isolé, ne peuvent être qu'imparfaitement connues.

Une culture peptonée, renfermant le pigment rouge, après élimination de la pyocyanine, est très fluorescente. Avec un excès d'ammoniaque, elle passe au rose jaunâtre. Si on neutralise par l'acide acétique et qu'on en ajoute un léger excès, on obtient une coloration rouge carmin.

Je n'ai pas trouvé de bon solvant organique du pigment rouge. Une culture rouge en peptone, traitée par l'éther, l'alcool amylique, l'éther-alcool amylique, ne cède pas trace de pigment rouge. La gélose peptonée, rouge carmin, traitée à l'ébullition par l'alcool éthylique, donne à celui-ci une teinte rose appréciable. L'alcool méthylique prend une teinte rose violacée. L'alcool-éther, l'acétone, le xylol sont restés sans effets dissolvants.

L'analyse spectrale de solutions de certaines substances colorées, offrant des bandes d'absorption très nettes, peut être d'un précieux recours dans l'étude des propriétés pigmentaires.

L'examen spectroscopique des cultures peptonées rouges, débarrassées au préalable de toute pyocyanine, a montré que le corps rouge n'offre pas d'absorption sélective, mais seulement une absorption continue, un peu plus marquée dans la région violette du spectre, sans atteindre toutefois la valeur d'une bande véritable.

Résumé des Caractères culturaux différentiels de G et de L

Pomme de terre non glycérinée

Ni G, ni L ne donnent de pyocyanine.

Pomme de terre glycérinée

Peu de pyocyanine pour G, beaucoup plus pour L. Pour G, tubercule brun noir, liquide jaune verdâtre. Pour L, tubercule multicolore devenant vert noir, puis noir, avec liquide vert, devenant brun vert intense.

Lait

Pour G et L, coagulation par une présure. Pour G, au douzième jour, digestion plus complète, liquide plus jaune, plus limpide, plus vert en surface que pour L.

Bouillon

Pour G, limpidité plus grande et fluorescence sensiblement plus intense que pour L. Celui-ci plus brun. Chez les deux variétés, fluorescence et pyocyanine.

Blanc d'œuf liquide au 1/3

G et L n'ont pas de pyocyanine. Pour L, fluorescence plus hâtive et plus intense que pour G.

Blanc d'œuf au 1/10 (Ebullition. Filtration)

G et L n'ont pas de pyocyanine. La fluorescence est plus faible pour L.

Eau peptonée

L est plus pyocyanogène et plus érythrogène que G.

CHAPITRE III

Propriétés de la Semence

Essais de suppression des fonctions Érythrogène et Pyocyanogène
Types érythrogènes par sélection

Hétérogénéité des Cultures

Wasserzug (1887, 1888) a particulièrement bien mis en relief les types différents de cellules, à propriétés différentes, au point de vue physiologique, dans une culture microbienne en apparence homogène, mais en réalité hétérogène. En effet, expérimentant avec le Bacille pyocyanique, il a montré :

1° Que dans une culture, « les cellules centrales ont parfois perdu leur matière colorante, quand les cellules périphériques l'ont encore conservée »;

2° Que « tous les articles d'une culture du microbe du pus bleu, ne sont pas également aptes à reproduire la matière colorante, ces différences individuelles s'accentuant au fur et à mesure que le milieu subit lui-même des modifications plus profondes ».

L'auteur, résumant ensuite la théorie qui ressortait de son expérimentation, écrit : « Toutes les cellules d'une même masse de levure n'ont pas le même pouvoir ferment, tous les bacilles ou toutes les spores d'une même culture de bactéridie charbonneuse ne sont pas également pathogènes. »

Il a même donné le procédé d'homogénéisation d'une culture, une culture homogène étant celle où « tous les éléments possèdent les mêmes caractères taxonomiques ». Enfin, comme la culture originelle renferme déjà des cellules incapables de former la matière colorante, le même savant a montré le risque qu'il y avait d'attribuer à la seule influence de l'agent ce qui est peut-être dû uniquement à la qualité et à l'état physiologiques de la semence employée.

Ce problème des propriétés de la semence, que je viens d'aborder, a été étudié par de nombreux auteurs.

Vieillissement des Cultures et Éducation de la Semence

Duclaux (1898) montre que l'identité des semences ne suffit pas pour obtenir l'identité des colonies et que l'hétérogénéité des cultures dépend de plusieurs facteurs.

dont les deux principaux sont la composition du milieu et les conditions extérieures (température, oxydation, etc.). Autrement dit, une culture vieille diffère d'une culture jeune, dans la composition de ses éléments cellulaires, d'où l'existence de types différents de cellules. Il rappelle les travaux de SCHOTTELIUS, avec *M. prodigiosus* (qui donne une teinte pourpre sur cultures en surface, teinte qu'on exalte par passages successifs), de GRÜBER et FIRTSCH (*B. proteus* d'HAUSER et le Spirille de FINCKLER-PRIOR), de SAN-FELICE (avec une foule d'autres bactéries).

DUCLAUX conclut, avec ses devanciers, que des colonies venant d'une même semence, présentent une variabilité plus ou moins marquée, quand la semence vieillit dans les milieux de culture. Donc, l'origine de la semence et l'âge de la culture sont des facteurs de premier ordre.

PASTEUR (1876), A. FITZ (1876-1882), PERDRIX (1891), GRIMBERT (1893), à partir de semences différentes, avaient déjà obtenu des cultures de caractères variables.

En ce qui concerne les chromogènes, LASSEUR (1911) montre l'importance de l'âge de la culture et de l'éducation de la semence dans la production de la chlororaphine. Il fait voir que des passages appropriés exaltent ou atténuent différentes fonctions d'une semence donnée.

Dans un autre travail (1913), dont les expériences portent sur *B. chororaphis*, *pyocyaneus*, *ceruleus*, *cyanofluorescens*, *syncyanus*, *Le Monnieri*, *mesentericus*, *subtilis*, *megatherium*, l'auteur estime que par passages sur milieux solides et synthétiques, en sélectionnant les colonies les plus colorées, on arrive au maximum de coloration. Enfin, il définit une culture homogène, au point de

vue de la pigmentation, en disant que « toutes les cellules y possèdent la propriété de produire un corps coloré dans un milieu donné », et que « les influences cellulaires individuelles n'apportent à la marche générale que des modifications secondaires ».

J'ai voulu profiter des propriétés physiologiques spéciales des différentes cellules d'une même culture, et *sélectionner* des *types particuliers*, remarquables par leur pouvoir chromogène.

C'est ainsi que je me suis proposé la résolution de deux problèmes :

Le *premier* consistait à enlever au microbe érythrogène, sa fonction propre, qui est de sécréter le corps rouge. Le microbe donnerait ainsi d'emblée la pyocyanine sans mélange de pigment rouge.

Le *second* consistait à supprimer la fonction pyocyanogène du microbe érythrogène, c'est-à-dire la sécrétion de la pyocyanine sur les milieux favorables à sa production. Le microbe donnerait ainsi d'emblée le corps rouge sans mélange de pyocyanine.

Je dois dire que je ne suis arrivé à supprimer complètement, ni le pigment rouge, ni la pyocyanine. Du reste, cette suppression complète d'un pigment est-elle vraiment réalisable ?

Gessard, à qui je fis part de mes recherches, me dit qu'il y aurait un grand intérêt à faire disparaître, dans la variété érythrogène, toute sécrétion de pyocyanine, mais qu'il fallait toutefois produire de quelque manière cette pyocyanine, par exemple sur son milieu réactif : gélose-peptone-glycérine, pour diagnostiquer à coup sûr l'espèce pyocyanique.

Je vais résumer mes recherches, bien que les problèmes n'aient pas été résolus comme je l'aurais désiré, mais elles m'avaient dès lors ouvert une voie féconde, qui devait aboutir à l'obtention de types originaux intéressants.

Essai de suppression de la fonction érythrogène

J'ai ensemencé en tubes, avec le microbe érythrogène, de l'eau peptonée neutralisée à 2 %. Le verdissement est apparu au bout de un à trois jours. Sans attendre le rougissement (cinquième ou sixième jour), j'ai ensemencé un deuxième tube avec le premier, processus que j'ai répété vingt-huit fois.

J'ai toujours observé le rosissement, consécutif au verdissement : je ne suis donc *pas* parvenu à *éliminer* le *pigment rouge*.

Essai de suppression de la fonction pyocyanogène, en milieux peptonés

1° Sur eau peptonée a 2 %

J'ai considéré une culture sur eau peptonée à 2 %, qui a rougi après cinq ou six jours, et dont le rougissement a atteint son maximum vers le quinzième four. A ce moment j'ai réensemencé de l'eau peptonée avec cette culture, et j'ai opéré ainsi treize passages : j'ai *toujours* observé le *verdissement préliminaire* et la *persistance* de la *pyocyanine*, qui se révèle par sa solubilité dans le chloroforme.

2° Sur gélose peptonée

J'ai pris des germes provenant d'une culture rouge sur eau peptonée, âgée de dix-huit jours, que j'ai passés sur

gélose peptonée en boîtes de PÉTRI. J'ai émulsionné une colonie rouge après quatre ou cinq jours et l'ai passée de nouveau sur boîtes. J'ai effectué ainsi vingt passages consécutifs.

La fonction érythrogène a été sensiblement atténuée, et au lieu de la coloration rouge carmin initiale, je n'ai plus observé qu'une teinte rose faible. *La quantité de pyocyanine a diminué* parallèlement à la quantité de corps rouge, mais est restée *constamment présente.*

3° SUR PEPTONE SALÉE

J'ai ensemencé de la peptone (2 %) salée (6 %). Les Bacilles, après vingt-quatre heures, ont été passés sur gélose peptonée en boîtes. J'ai obtenu des colonies d'un pouvoir érythrogène exalté. Ces colonies, cultivées en peptone salée pendant quinze jours, l'opération étant répétée quatre fois consécutives, j'ai passé ensuite les microbes sur gélose peptonée en boîtes de PÉTRI.

Il y avait eu accoutumance des germes au chlorure de sodium et je n'ai plus obtenu d'exaltation du pigment rouge, celle-ci ne s'appliquant vraisemblablement qu'aux générations microbiennes engendrées au début du temps de contact du sel avec le Bacille non acclimaté. Au contraire, j'ai remarqué, au bout de trois jours, un rosissement très faible, et, au bout de sept jours, une coloration rose brun. Une colonie repiquée sur gélose peptonée n'a plus produit que des colonies rose brun.

CONCLUSION : *La pyocyanine existait toujours.*

4° SUR COLONIE ROUGE

J'ai choisi, sur gélose peptonée en plaque, une colonie rouge isolée, particulièrement bien développée, et âgée

de quatre ou cinq jours. Après l'avoir émulsionnée, je l'ai passée de nouveau sur même milieu, et j'ai répété huit fois ces opérations, en m'appliquant à prendre sur chaque plaque la colonie la plus colorée.

J'ai *toujours* pu déceler, dans ces cultures, la *présence* de *pyocyanine*.

Types érythrogènes par sélection

5° Sur : Eau peptonée - Gélose peptonée - Eau peptonée

Les Bacilles d'une culture rouge sur eau peptonée, âgée de quinze jours, ont été passés sur gélose peptonée en boîtes de Pétri. Au bout de quatre jours en moyenne, les quinze à vingt colonies les plus érythrogènes ont été passées de nouveau sur eau peptonée. J'ai choisi, après quinze jours, le tube de culture le plus rouge, et j'ai recommencé le cycle. J'ai répété ce mécanisme pendant sept mois. J'ai obtenu des *résultats* de *deux sortes :*

A) J'ai *sélectionné un premier germe*, où le *pigment jaune verdâtre* est produit *en plus grande quantité* qu'au début.

Il n'y a pas eu suppression de la fonction pyocyanogène : au contraire, les quantités de pyocyanine et de corps rouge se sont accrues parallèlement; la présence du pigment fluorescent a persisté.

C'est ce type que j'ai appelé *type érythrogène* au *maximum* : il sécrète plus de pyocyanine et de corps rouge que l'échantillon moyen;

B) Par contre, une colonie sur boîte de Pétri, du dixième passage, soit après sept mois, était fort peu éry-

throgène, bien que je l'eusse obtenue avec une culture très rouge sur peptone (1). Cette colonie, peu chromogène, a donné sur eau peptonée une coloration vert brun, sans rouge, au bout d'un mois. J'ai passé les cellules de cette culture sur boîte de PÉTRI, où il ne s'est plus manifesté qu'une très faible coloration rose. Ayant opéré des passages successifs sur eau peptonée, je n'ai pu supprimer complètement la fonction érythrogène, encore appréciable sur milieu peptoné solide, mais j'ai obtenu un *deuxième type, érythrogène au minimum,* où il y a *extrêmement peu* de *corps rouge*, puisque la *solution* de *peptone ne rougit plus.*

D'autre part, comme pour le type érythrogène au maximum, il y a une *variation parallèle* de la *pyocyanine* et du *corps rouge*. Pour le type érythrogène au minimum, il y a très peu de corps rouge et très peu de pyocyanine, c'est-à-dire qu'il n'y a *pas* encore *suppression complète* de la *fonction pyocyanogène.*

CONCLUSIONS. — Les deux germes que j'ai sélectionnés sont toujours deux germes érythrogènes, puisque le corps rouge conserve la prépondérance vis-à-vis de la pyocyanine, non seulement dans le type exalté, mais aussi dans le type au minimum. En effet, les deux pigments sécrétés par ce dernier, si peu abondants qu'ils soient, ont diminué dans les mêmes proportions.

J'ai pu seulement diminuer la sécrétion du pigment jaune verdâtre, au point que, une fois oxydé dans les solutions de peptone, il ne les rougit plus; mais ce non-

(1) Ce qui montre bien qu'une culture très chromogène peut donner naissance à des colonies peu chromogènes.

rougissement n'est pas dû à la prépondérance de la pyocyanine, comme c'est le cas dans la variété pyocyanogène et dans la variété érythrogène cultivée sur peptone glycérinée.

Un type pyocyanogène me semble difficile à obtenir, en partant de la variété érythrogène, contrairement à l'opinion de GESSARD (1), qui m'avait engagé dans cette voie, mais sans être cependant certain de la possibilité de résoudre le problème.

A mon avis, on ne peut retirer de la variété érythrogène la variété pyocyanogène, et inversement, parce que les quantités des deux pigments : pyocyanine et jaune verdâtre, croissent ou décroissent ensemble.

---

(1) Communication personnelle du 22 septembre 1918.

CHAPITRE IV

Races A et F de la variété Érythrogène, obtenues avec l'échantillon de Lasseur

Les recherches de Wasserzug (1887, 1888), qui ont porté successivement sur la physiologie et la morphologie des bactéries, ont montré qu'on peut « abolir d'une façon permanente la fonction productrice de matière colorante, dans les milieux pour lesquels cette fonction est normale ». Dans un autre ordre d'idées, le même auteur a pu « modifier la forme assez profondément pour que le microbe, rapporté dans son milieu originel, y prenne et y conserve une forme différente de la forme définitive ».

Duclaux (1898), nous l'avons vu (p. 48), avait démontré qu'une vieille culture ne possède plus les mêmes caractères qu'une jeune culture, du fait de l'influence : 1° du milieu; 2° des conditions extérieures. Ce savant,

résumant les expériences de PASTEUR, rappelle que celui-ci a mis le premier en évidence, avec le choléra des poules, l'influence de la vieillesse, appelant « vaccin » ce que DUCLAUX appelle « produits de cultures vieillies ». Les cultures vieillies transmettent leurs propriétés par leur réensemencement. PASTEUR montre ainsi la dégradation organique et la transmission héréditaire. DUCLAUX signale qu'il en est de même pour la pigmentation. SCHOTTELIUS a fait perdre à *M. prodigiosus* la propriété de sécréter le pigment rouge, par passages successifs sur milieux culturaux. Il y a donc chez les vieilles cultures une atténuation marquée des propriétés.

Par suite de l'altération du substratum, la cellule bactérienne peut perdre son pouvoir chromogène, cette perte étant une des formes de la dégénérescence, qui atteint toutes les propriétés cellulaires. La conclusion pratique qui s'impose est la possibilité d'atténuer ou de supprimer la chromogénèse d'une semence donnée.

J'ai dit (p. 16), que GESSARD (1891) avait pu, dans certaines conditions, obtenir des races du Bacille pyocyanique, capables de sécréter tel ou tel pigment. L'auteur, d'après l'aspect des cultures en bouillon, a créé quatre types, reconnus identiques dans les variétés pyocyanogène (1891) et mélanogène (1901), soient les races A, P, F, S.

La race A est pyocyanogène et fluorescigène en bouillon;
La race P est exclusivement pyocyanogène en bouillon;
La race F est exclusivement fluorescigène en bouillon;
La race S ne donne pas de pigment en bouillon.

Ces races sont bien décrites par GESSARD (1902).

Le germe érythrogène de GESSARD (1898), germe primitivement de race A (pyocyanine et fluorescence dans le bouillon), a dégénéré, au cours des réensemencements successifs, en race F, qui ne produit que de la fluorescence dans le bouillon. GESSARD en conclut à la nécessité de l'emploi séparé du bouillon et de la peptone pour les cultures microbiennes, le mélange bouillon peptoné ne permettant pas de discerner les réactions propres à chaque milieu.

Quant au germe érythrogène de LASSEUR, en le réensemençant successivement, pendant une année, en bouillon (1) de même composition que celui de GESSARD, j'ai pu lui faire perdre également la propriété de sécréter de la pyocyanine en bouillon, l'amenant lui aussi de la race A à la race F. La race F ne constitue pas une modification définitive des propriétés chromogènes du Bacille pyocyanique, puisqu'on peut retrouver la pyocyanine, en injectant le microbe dans le péritoine d'un cobaye, ou en le passant sur le milieu réactif de GESSARD (gélose 3 %, peptone 2 %, glycérine 5 %).

J'ai cru utile de donner les différences entre les deux races A et F du microbe L de LASSEUR, sur les milieux déjà étudiés et classés comme précédemment en deux catégories :

1° Milieux non peptonés;

2° Milieux peptonés.

---

(1) Décoction pendant une demi-heure de viande de bœuf ou de veau, pour un rendement de bouillon de poids double, qu'on neutralise ensuite.

I. — MILIEUX NON PEPTONÉS

Milieux usuels

Gélatine a 10 % (simple solution neutralisée)

Les races A et F ne donnent ni pyocyanine ni fluorescence, et se comportent de façon analogue sur le même milieu, où j'ai ajouté 1 % de glucose.

Gélatine nutritive (ou gélatine au bouillon)

Pour A, après quarante-huit heures, la liquéfaction d'abord faible, après quatre jours, devient très nette, en formant un entonnoir de un centimètre de profondeur; après sept jours, elle s'accentue, peu à peu l'entonnoir se transforme en un cylindre dans lequel le liquide atteint une hauteur de un centimètre et demi et, après neuf jours, de deux centimètres.

Pour F, après quarante-huit heures, il n'y a pas de développement bien apparent; après quatre jours, on observe un liquide de même volume et de même forme qu'une demi-graine de petit pois. Pour F, après sept jours, il y a quatre fois moins, et après neuf jours, deux fois moins de liquide que pour A. Vers le dix-huitième jour, la liquéfaction est identique pour les deux races. Pour A et F, le liquide d'abord jaune verdâtre devient à la longue vert orangé pour la première et vert pour la deuxième. Pour F, l'éclaircissement s'effectue mieux.

Conclusion. — Pour A, la liquéfaction est beaucoup plus rapide et avec le temps le liquide est plus jaune, mais moins limpide que pour F.

Pomme de terre glycérinée

Tubercule. — *Race A.* — Après vingt-quatre heures, le tubercule est jaune terreux, sauf sur un demi-centimètre de hauteur à partir de la base, où il est verdâtre; après quarante-huit heures, le tubercule est multicolore; après soixante-douze heures, il verdit par plages, pour passer après six jours au vert noir, présentant un enduit épais et visqueux. Au huitième jour, il devient noir, avec la partie supérieure jaune brun, au douzième jour se dessèche et au quinzième jour se ratatine.

Race F. — Après vingt-quatre heures, le tubercule est jaunâtre, sauf la base qui bleuit et une ou plusieurs faces qui prennent des enduits rouge, orangé, vert et jaune or. Après quarante-huit heures, le tubercule tout entier est multicolore et particulièrement vert à la base. Après six jours, il est vert intense, de nuance brun noir, jamais pur. Au bout de neuf jours, le tubercule est encore multicolore; au quinzième jour, il devient gris brunâtre, puis, au vingt-cinquième jour, brunâtre, rarement noirâtre, sans la belle coloration noir vif caractéristique, observée avec A. Après trente jours, la teinte gris terreux prédomine.

Liquide. — *Race A.* — Après vingt-quatre heures, le liquide est trouble et incolore, avec dépôt; après soixante-douze heures, il est verdâtre et louche; après six jours, vert intense à la partie supérieure et jaune or à la partie inférieure; au douzième jour, rouge brun presque noir; au bout de quinze jours, rouge noir, et après vingt-cinq jours brun noir ou noir.

Race F. — Après vingt-quatre heures, le liquide est trouble; après quarante-huit heures, incolore; après six jours, vert très faible. Au bout de neuf jours environ, la multicoloration qui débute s'accentue jusqu'au quinzième jour; à partir de ce moment et jusqu'au vingt-cinquième jour, les colorations jaune, brun et brun rouge prédominent. Enfin, après trente jours, on ne note plus qu'une coloration brun intense, sans noir ni rouge nets.

Observation. — J'ai, cette fois encore, pu apprécier le rôle considérable de la glycérine dans la pigmentation, notamment en ce qui concerne les colorations rouge, verte et noire.

Pigmentation. — Pour A, il y a beaucoup plus de pyocyanine que pour F.

Conclusion. — A donne un tubercule noir et un liquide brun noir ou noir. F donne un tubercule gris terreux et un liquide brun intense sans noir.

Pour F, il y a donc une atténuation très marquée des teintes.

Bouillon

C'est, comme on sait, à partir du bouillon qu'on établit les caractères distinctifs des races, la race A sécrétant de la fluorescence avec pyocyanine, la race F, de la fluorescence sans pyocyanine.

Race A. — Après vingt-quatre heures, le bouillon présente un voile, et une coloration vert fluorescente. Au troisième jour, la pigmentation jaune verdâtre s'est accentuée, pour donner, au sixième jour, un jaune or mêlé de vert, puis au quinzième jour mêlé de brun, et au vingt-

cinquième jour, comme terme final, un jaune brun franc. Après quarante-huit heures, la limpidité commence à se manifester et s'accroît régulièrement.

Race F. — Après vingt-quatre heures, le pigment vert fluorescent est déjà apparent. Il donne, après six jours, à la culture, une teinte jaune verdâtre, après douze jours, citron, après quinze jours, citron, mêlée d'un peu de vert. Au bout de trente jours, le liquide ne s'éclaircit pas et est encore excessivement trouble.

Conclusion. — A donne un liquide brun et F un liquide citron, moins coloré et moins clair que A.

Milieux spéciaux

Lait

Les deux liquides, pour A et pour F, sont coagulés par une présure. Pour A, au bout de trois jours, la liquéfaction de la caséine s'effectue au tiers; au bout de quatre jours, à moitié; au bout de six jours, aux deux tiers; au bout de huit jours, aux trois quarts, et après douze jours, devient totale ou à peu près. Pour F, après six jours, la liquéfaction ne s'effectue qu'à la moitié ou au tiers; après huit jours, aux deux tiers; après neuf jours, aux quatre cinquièmes, et après douze jours, est presque totale.

Pour A, le liquide passe du jaune sale (six jours) au rouge orangé (neuf jours), au jaune or (douze jours), au jaune rougeâtre (vingt-cinq jours), pour devenir finalement rougeâtre et semi-limpide (trente jours).

Pour F, après douze jours, le liquide, qui est jaune paille, accentue légèrement sa coloration sans donner de teinte rougeâtre, et d'autre part, ne s'éclaircit guère.

Pigmentation. — Alors qu'on observe des taches bleues de pyocyanine dans la couche crémeuse de A, celle de F ne révèle pas ce pigment.

CONCLUSION. — A manifeste de la pyocyanine en surface. F n'en a pas. Pour A, la digestion est plus rapide et plus complète que pour F. A donne un liquide jaune or ou jaune rougeâtre, semi-limpide, F un liquide jaune paille, non rougeâtre, trouble.

MILIEUX AU BLANC D'ŒUF

(Préparations indiquées, page 33)

1° BLANC D'ŒUF LIQUIDE. — Alors que pour A, à partir du troisième jour, la fluorescence s'accroît nettement et de façon constante, pour F, elle ne devient visible qu'au cinquième jour, et au huitième jour, elle est moins intense que pour A.

Pigmentation. — Ni pour A, ni pour F, il n'y a sécrétion de pyocyanine.

CONCLUSION. — A est plus fluorescent que F.

2° BLANC D'ŒUF AU 1/10 (Ebullition, Filtration). — Pour A, le développement, d'abord achromogène (vingt-quatre heures), montre une coloration bleu verdâtre (trois jours), qui s'accentue très nettement, surtout en surface (sept jours).

Pour F, après trois jours, la culture a une faible teinte vert bleuté, qui s'accroît légèrement avec le temps. La fluorescence est très faible.

Si on traite par l'eau oxygénée deux cultures de A et de F, au septième jour, la culture de A donne seule une coloration rose intense. Avec F, l'ammoniaque donne une

coloration vert pomme et avec A, une coloration jaune verdâtre avec pointes roses.

Pigmentation. — Il n'y a pas de pyocyanine.

CONCLUSION. — A donne une culture plus fluorescente que F.

3° BLANC D'ŒUF COAGULÉ (dans l'eau physiologique). — Pour A, au quatrième jour, la digestion est faible, avec un liquide très légèrement verdâtre, qui, au sixième jour, accentue sa coloration, en devenant jaune verdâtre. Au septième jour, la digestion est peu intense, et, au neuvième jour, on remarque une chromogénèse abondante.

Pour F, au bout de neuf jours, la digestion est à peu près nulle. Le liquide trouble n'est pas chromogène.

Pigmentation. — Pour A et pour F, il n'y a pas de pyocyanine.

CONCLUSION. — A digère plus visiblement que F, en donnant un liquide chromogène que ne donne pas F.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES

J'ai expérimenté les milieux I et II de LASSEUR. A, sur ces milieux, donne un développement plus chromogène que F. La pyocyanine se retrouve avec les deux races, sur les deux milieux. Les différences entre A et F sont plus apparentes sur milieu I de LASSEUR, solidifié (composition : 10 cm³ gélose simple à 2 %, 2 cm³ milieu liquide, en tube incliné).

A, au bout de vingt-quatre heures, est vert. Après quarante-huit heures, il devient vert brunâtre; au cinquième jour, brunit de plus en plus; au sixième jour, devient vert brun très foncé, avec nuances roses.

F, au bout de quarante-huit heures, est vert et, au cinquième jour, devient vert jaune or, puis, au sixième jour, vert jaune orangé, sans manifester de coloration brune ou rose.

II. — MILIEUX PEPTONÉS

Eau peptonée a 2 %

A, après vingt-quatre heures, donne une coloration jaune verdâtre fluorescente, qui, après quarante-huit heures, s'accentue; après six jours, devient jaune vert clair; après huit jours, brun rouge, puis, après douze jours, rouge carmin, tandis que la teinte de F, après soixante-douze heures, légèrement vert jaune, passe, après six jours, au gris verdâtre, devient après huit jours, « feuille morte », et atteint après neuf jours, une teinte rose brun qui, après douze jours, s'accentue légèrement. Après soixante-douze heures, le liquide de A, semi-limpide, après neuf jours, presque limpide, au douzième jour l'est parfaitement, tandis que le liquide de F reste toujours louche.

Pigmentation. — Pour A et F, on retrouve les trois pigments habituels, mais en moins grande quantité pour F.

Conclusion. — A devient rouge, mais F ne donne plus qu'une coloration rose et reste trouble, alors que A est bien éclairci.

Résumé comparatif des Caractères culturaux des Races A et F, de la Variété érythrogène

(Echantillon de LASSEUR)

Gélatine

Pour A, la liquéfaction est plus rapide, le liquide plus jaune mais moins limpide que pour F.

Pomme de terre glycérinée

Les cultures de A donnent un tubercule et un liquide noirs, celles de F un tubercule gris terreux et un liquide brun.

Bouillon

Les races A et F sécrètent le pigment fluorescent, la première seulement la pyocyanine. Pour A, le liquide est brun; pour F, il est jaune citron et moins clair que celui de A.

Lait

Pour A, on observe des taches bleues de pyocyanine en surface, dont F est privé. Le liquide de A est jaune or ou jaune rougeâtre, semi-limpide. Le liquide de F, jamais rougeâtre, est tout à fait trouble. Pour F, la digestion est moins rapide et moins complète que pour A.

Milieux a l'albumine d'œuf

Il ne se produit pas de pyocyanine; A possède un pouvoir digestif et fluorescent plus grand que F.

Milieux synthétiques Lasseur

La présence de pyocyanine se révèle pour les deux races et les deux milieux. A est plus chromogène que F.

Eau peptonée

Une culture ensemencée avec A devient rouge. Ensemencée avec F, elle s'éclaircit moins et devient moins colorée.

Conclusion générale

La race F *se différencie donc de la race* A, *par la perte de la pyocyanine ou une diminution du pouvoir chromogène et d'une façon générale par une atténuation des propriétés physiologiques.*

CHAPITRE V

Généralités sur les antiseptiques
Antiseptiques Salins
Action sur le Bacille Pyocyanique érythrogène

J'appréciais, dans la chromogénèse, le rôle considérable du chlorure de sodium, qui exalte la sécrétion du pigment rouge en peptone salée cultivée avec le Bacille érythrogène (p. 42) et tantôt j'observais, comme phénomène secondaire, qu'une solution à 7 % de sel ne se développait pas, alors qu'à 8 %, elle cultivait nettement. Dans d'autres cas, une solution à 7 % devenait rapidement stérile, alors qu'une solution à 8 % renfermait encore des germes vivants au bout d'un temps très long. Le peu de constance de ces résultats m'incitait à approfondir la question.

Je me suis appliqué à déterminer, en peptone salée, la dose exacte de sel, à laquelle le Bacille pyocyanique

cesse de vivre, c'est-à-dire l'action antiseptique du chlorure de sodium sur la variété érythrogène.

Ayant étudié le chlorure de sodium, j'ai voulu, par extension, me faire également une idée approximative du pouvoir bactéricide d'autres sels métalliques.

Le problème de l'antisepsie était posé.

Généralités

I. — Définition et Mode d'action d'un Antiseptique

Si l'on met au contact intime d'une cellule vivante, une quantité très faible d'une substance qualifiée d' « antiseptique », la cellule, loin d'être gênée dans ses fonctions, est excitée, acquiert un regain de vitalité et son développement se manifeste de façon plus intense. L' « antiseptique » se comporte comme un véritable aliment et son action est favorisante.

Le phénomène de nutrition produit par l'antiseptique, a été décrit de façon magistrale, par DUCLAUX (1898), qui a établi les liens de parenté très étroite, qui existent entre l'antiseptique et l'aliment; par STADLER (1899), qui a montré l'existence de bactéries pour lesquelles la vitalité dans le sel devient plus puissante; par ALOY et BARDIER (1902), dans leurs expériences relatives à l'action des sels sur les êtres vivants.

De même JAVILLIER (1907) a déterminé l'influence de très petites doses de zinc sur la végétation de *Sterigmatocystis nigra*.

Trillat et Sauton (1909) ont observé dans le développement cellulaire, avec les gaz agissant à faible dose, une accélération qu'ils ont expliquée par la même composition qualitative des gaz et des cellules (C, H, N, S, P).

Levi D. Vida (1909) a conclu à l'influence favorable de NaCl à 1 % sur le Vibrion cholérique, mais a observé qu'au lieu de préparer toujours des solutions bactériennes dans l'eau chlorurée sodique, on devrait employer une solution du sel qui convient le mieux au microbe.

Delêpine (1910) et Sperlich (1912) ont démontré qu'à dose faible, un antiseptique est un excitant.

En dehors de cette action favorisante d'une substance antiseptique à faible dose, cette même substance pourra n'agir en rien sur le développement bactérien, mais employée à dose plus forte, elle aura des effets plus ou moins nuisibles : elle pourra entraver le développement microbien et même l'arrêter tout à fait. Ce ralentissement dans la vitalité cesse, et le développement redevient normal, quand on rend à la cellule ses conditions normales d'existence.

Par contre, si on laisse l'antiseptique poursuivre son action, il sera susceptible de tuer toutes les cellules vivantes.

Kossiakoff (1887) montre que les antiseptiques avant d'être des agents destructeurs, retardent l'évolution microbienne.

Aloy et Bardier (1902) distinguent les doses ralentissantes, empêchantes et toxiques.

Gilbert et Carnot (1904), expérimentant avec le chlorure de sodium, voient qu'il agit, *in vivo* sur le Pneumocoque en diminuant sa végétabilité.

Manoilow (1907), constate l'existence de doses empêchantes, puis des doses mortelles avec les sels de nickel.

Eisler (1909) distingue dans l'action d'une solution saline sur la cellule, un temps d'arrêt avant la mort.

Delêpine (1910) appelle antiseptique un produit arrêtant le développement microbien, et désinfectant, un produit tuant le microbe.

Sperlich (1912) montre l'action empêchante des sels, succédant à l'action excitante. Le phénomène de disparition de la chromogénèse dans une culture en présence d'antiseptique, est un symptôme de ralentissement de la vie cellulaire, l'organisme vivant étant ainsi privé d'une de ses fonctions essentielles.

D'autre part, selon Raulin (1870), le mot d'antiseptique n'a pas de sens général, une substance pouvant être antiseptique pour un microbe, sans l'être pour un autre.

Enfin, les antiseptiques peuvent être des produits divers, appartenant à l'un des trois états de la matière : solide, liquide ou gazeux.

Trillat et Sauton (1909), Hailer (1911), avec l'anhydride sulfureux, ont montré que certains gaz étaient susceptibles d'agir comme antiseptiques.

II. — Facteurs qui déterminent le pouvoir antiseptique

Pour déterminer le pouvoir antiseptique d'une substance, vis-à-vis d'un microbe donné, il faut faire intervenir un grand nombre de facteurs. Il importe, avant tout, de connaître l'origine de la semence, dont Buchholtz, dès 1875, a fait le premier remarquer l'importance.

L'âge de la semence joue particulièrement un grand rôle, une semence vieille présentant à l'action de l'antiseptique, une résistance moindre qu'une semence jeune.

Etant bien fixé sur le degré de vitalité de la bactérie, Duclaux dit qu'il faut savoir si elle est adulte ou à l'état de spores (1883), à quelle espèce et à quelle race elle appartient (1898). C'est seulement quand il y a identité physiologique des microbes ensemencés, condition sur l'importance de laquelle insiste déjà Duclaux (1883), que toutes les cellules, d'après Delêpine (1910), présentent la même résistance.

Un nouveau facteur intervient ensuite et se rapporte à l'origine des germes. Ceux-ci peuvent avoir ou n'avoir jamais subi l'action de l'antiseptique. Dans le premier cas, le microbe présente une plus grande résistance au produit toxique, il est accommodé. Kossiakoff (1887) dit que les organismes inférieurs soumis aux antiseptiques à doses graduellement croissantes, vivent et se développent dans des solutions de ces antiseptiques qui, agissant sur ces organismes non acclimatés. en empêchent le développement. D'après Masson (1910), qui étudie les modalités de l'accommodation, la bactérie atteint le degré le plus élevé de l'accoutumance en procédant par étapes. cette accoutumance étant suivie de régression vers la résistance normale, son terme final.

La nature de la semence définitivement établie, il importe, selon Charrin et Roger (1887), Kossiakoff (1887). et Duclaux (1898). de connaître le nombre d'organismes microbiens entrant en expérience.

Les organismes sont ensuite mis en présence de l'antiseptique, dont la composition doit, d'après Charrin et

Roger (1887), être rigoureusement connue, ainsi que, comme l'a signalé Duclaux (1883), la réaction (alcaline ou acide) déterminée.On évite ainsi que le milieu soit la source de réactions secondaires. Boillat montre en effet que le chlorure de zinc précipite en présence de substrata albumineux. Miquel (1883) et Behring (1888) constatent que le sublimé perd, en milieux alcalins, une partie de sa puissance antiseptique. Gianlucco (1908) montre que l'action antiseptique et toxique des métalloïdes se modifie au contact des matières protéiques et albuminoïdes.

Le pouvoir antiseptique est aussi fonction de la température, à laquelle s'effectue l'expérience.

Levi D. Vida (1909) fait observer qu'il n'est pas indifférent non plus de connaître l'état de repos ou de mouvement du milieu dans lequel s'effectue la réaction.

Enfin, la durée de l'expérience est peut-être le plus important de tous les facteurs.

Les facteurs principaux de l'antisepsie étant ainsi connus, il reste à déterminer l'un d'eux, après avoir fait successivement varier les autres. En général, la quantité d'antiseptique est posée comme inconnue.

III. — Méthodes de détermination et techniques

Hailer (1911) distingue deux méthodes de détermination du pouvoir antiseptique : 1° *méthode statique;* 2° *méthode cinétique.*

1° La méthode *statique* consiste à mettre le germe en présence du milieu toxique et à noter le temps qui s'écoule avant le développement cultural. En même temps, on

s'assure s'il reste des germes vivants, en débarrassant la cellule de l'antiseptique et en la réensemençant sur milieu normal;

2° La méthode *cinétique* consiste en l'action de la substance toxique sur la culture. De temps en temps, on prélève une certaine quantité du milieu, et on l'ensemence. On note l'époque à laquelle se produit la mort.

On a remarqué des différences très sensibles dans les résultats donnés par les deux méthodes, car si, d'une part, il est plus facile d'empêcher le développement (méthode statique), que de l'entraver (méthode cinétique), il faut tenir compte, dans cette dernière méthode, des produits de désassimilation rejetés par la vie microbienne, surajoutés à l'antiseptique considéré, et aussi de la résistance à la mort qui a baissé par suite de la non-identité physiologique des cellules.

Je rappelle pour mémoire la méthode de Jalan de La Croix (1881), qui consiste à exposer à l'air, d'une part du bouillon, d'autre part, du bouillon antiseptisé. Comme on ignore totalement la nature des organismes contenus dans l'air, qui ensemencent diversement les milieux, on se rend compte de la défectuosité du procédé.

Miquel (1883, 1884), dans ses remarquables travaux sur l'antisepsie, détermine deux doses :

1° La dose antiseptique, qui tue la bactérie;

2° La dose infertilisante, qui en suspend les manifestations vitales, en rendant le milieu impropre à la vie bactérienne.

Yersin (1888) ajoute une solution antiseptique à une culture en bouillon du bacille tuberculeux. Après des

temps donnés, il lave les germes à l'eau et les réensemence en milieu normal.

De Christmas (1892), craignant que l'eau ne tue les organismes affaiblis par leur contact avec l'antiseptique, remplace l'eau par le bouillon.

Duclaux (1898) évite les produits de déchets de la vie bactérienne en mettant d'emblée le germe avec l'antiseptique expérimenté.

Stadler (1899) s'assure qu'il reste des germes vivants dans la culture en milieu antiseptique, par passages à intervalles réguliers sur gélatine nutritive, et numère ensuite les colonies.

Guéguen (1908) opère avec des séries de tubes, contenant le milieu nutritif de sa composition; il y ajoute des quantités variables d'antiseptique, puis ensemence. Le dernier tube où le développement s'arrête, détermine la dose infertilisante, et le dernier tube renfermant des germes vivants, la dose antiseptique.

Delêpine (1910) mesure le pouvoir désinfectant en calculant pour causer la mort : 1° d'une part la dilution exactement suffisante; 2°, d'autre part, la dilution exactement insuffisante.

ANTISEPTIQUES SALINS

Phénomènes physico-chimiques. — Rôle dans la détermination bactérienne.

Les antiseptiques salins sont particulièrement importants à étudier à cause du phénomène de l'ionisation. Dans l'ionisation, il faut tenir compte de la concentration de la

solution. Dans des solutions très diluées et pour certains sels, il n'y a que des ions (anions et cations), qui sont des facteurs de la toxicité, tandis que pour d'autres concentrations, il existe en outre, les molécules intégrales des sels.

On abaisse la toxicité en diminuant l'ionisation, d'une solution d'un sel particulièrement toxique, tel que le bichlorure de mercure, $HgCl^2$, qui doit surtout sa toxicité à l'ion $^{++}_{Hg}$, par apport au système d'un ion commun $^{-}_{Cl}$, fourni par un chlorure, alcalin par exemple.

Les solutions salines possèdent une pression osmotique à laquelle réagit le protoplasma bactérien. Cette réaction, particulièrement précieuse quand les espèces bactériennes ont les mêmes caractères morphologiques et des propriétés physiologiques voisines, varie avec ces espèces pour un sel donné, permettant ainsi leur différenciation.

Miquel (1891) dit que « le procédé basé sur l'inégal pouvoir antiseptique de quelques corps est précieux pour l'isolement des bactéries saprogènes ». Il emploie, dans ce but, le chlorure de sodium en solution de 5 à 15 %, la glycérine, le borate de soude, etc.

Maillard (1898) rappelle les travaux de Kahlenberg et True (1896), de Paul et Krœnig (1896), qui mettent en lumière le rôle de l'ionisation dans l'action des antiseptiques, sur les spores de *B. anthracis*. Maillard cite Loeb (1898), pour lequel déjà se fait sentir dans ses expériences l'influence des ions libres, et conclut, pour sa part, à l'abaissement de la toxicité et de l'ionisation, du sulfate de cuivre additionné de sulfates alcalins.

Paulesco (1904) fait valoir que les doses-limites de

sels, supportées par une bactérie, ne sont pas absolument proportionnelles aux poids moléculaires des sels.

Guillemard (1908) montre que dans un sel c'est l'acide, surtout quand il est polyatomique, qui différencie la bactérie.

Eisler (1909) insiste particulièrement sur l'importance du cation et de la valence.

Guillemard (1909) étudie la résistance extrêmement variable à la pression osmotique des végétaux inférieurs et définit le point osmotique : la concentration-limite de solution saline, à laquelle végète un microbe, concentration-limite variable avec la quantité du milieu de culture.

Dubois (1910) distingue *B. Coli commune* de *B. pseudo Coli commune*, grâce à leurs réactions différentes sur les sels.

Guillemard (1910) résume ses travaux sur la pression osmotique, en disant qu'elle réagit sur la bactérie suivant un double mécanisme :

1° La concentration moléculaire détermine une action purement quantitative;

2° La dissociation électrolytique produit des effets d'ordre spécifique, en rapport avec la nature des ions en présence dans la solution osmosante.

HISTORIQUE DES TRAVAUX

Sels alcalins

De nombreux auteurs ont étudié l'action des sels alcalins, en particulier du chlorure de sodium, sur les bactéries.

Wasserzug (1887) voit que le B. pyocyanique végète dans le bouillon de veau renfermant une concentration de 6,5 à 7 % de chlorure de sodium, la pyocyanine n'étant plus sécrétée pour un taux de sel supérieur à 5 %.

Stadler (1899) conclut à l'action antiseptique du chlorure de sodium à haute dose. L'auteur mentionne le procédé Pœkel, qui consiste dans le lavage à l'eau salée (6 à 8 %) des récipients où l'on conserve les aliments. Il dit que Forster à Amsterdam a décrit une quantité de bactéries et de levures ayant des affinités pour le sel, et que Wehmer a isolé de la saumure de hareng, une levure supportant une concentration saline de 15 %.

Gilbert et Carnot (1904) constatent des cultures abondantes de Pneumocoque dans un milieu contenant de 5 à 8 p. 1.000 de sel. Elles deviennent de plus en plus claires, lorsqu'il y a 8 à 12 p. 1.000 de sel, et de plus en plus difficiles à 13 p. 1.000.

Lafforgue (1905) signale que le chlorure de sodium, injecté en solution hypertonique, exalte le pouvoir pathogène des saprophytes (Ex. *B. mesentericus*).

Muller (1910) étudie l'influence du chlorure de sodium sur la végétation du bacille de la morve et du bacille tuberculeux. Les cultures de ce dernier résistent pendant dix à quinze jours à l'action de solutions concentrées de sel. L'auteur ajoute que le bacille tuberculeux résiste plusieurs mois au pouvoir antiseptique du chlorure de sodium (c'est également l'opinion de Forster, de Freytag et de Galtier), et il propose d'ajouter 15 à 20 % de sel, au lait dans lequel on recherchera le B. de Koch.

Loeb et Wasteneys (1910-1911) étudient longuement l'action toxique sur les cellules, des sels alcalins pris en

association d'abord, isolément ensuite, permettant ainsi de définir le rôle particulier à chaque métal.

KIESEL (1912) démontre que l'activité des acides et des sels sur les bactéries ne correspond pas, dans la plupart des cas, à leur action chimique et que l'effet toxique des acides et des sels acides est dû :

1° A leur fonction chimique et à leur degré différent de dissociation;

2° A leur mode de pénétration à travers le protoplasma.

KARAFFA-KORBUTT (1912) note l'impossibilité de cultiver les bacilles du groupe Coli sur des milieux dont la concentration atteint 8 à 9 % de sel. Les bacilles du groupe Septique sont gênés seulement pour une dose de 10 et 12 %, les variétés de Torula se développant encore lorsque le taux salin est de 25 %. Les microbes sporulés résistent indéfiniment à des doses de chlorure de sodium, qui s'opposent relativement vite au développement des bacilles asporogènes.

SPERLICH (1912), expérimentant avec des bactéries et le chlorure de sodium, voit que la moitié environ des espèces atteint un développement complet dans les milieux nutritifs contenant 3 % de sel. Certaines bactéries sont favorisées par la présence de 0.5 % de sel, la végétation s'arrêtant pour une concentration comprise entre 6 et 10 %.

COUPIN (1915), étudie la végétation des bactéries marines dans la salure. Le milieu ensemencé est de l'eau peptonée à 1 %, à laquelle il a ajouté des quantités variables de sel. Quatre bactéries supportent l'addition d'une proportion de sel de 8 %, et c'est la dose la plus faible tolérée par toutes les bactéries, l'une d'elles n'étant pas tuée

par le chlorure de sodium à la concentration de 16 %. Comme ces microbes viennent de l'Atlantique, où la salure est de 2,5 %, on voit qu'ils peuvent vivre en présence de trois à cinq fois plus de sel que dans leur milieu normal.

Sels lourds et sels alcalino-terreux

Kossiakoff (1887) étudie l'action antiseptique du bichlorure de mercure. Il constate que ce sel se combine aux matières albuminoïdes du bouillon, ce qui rend difficile l'évaluation de la quantité d'antiseptique restant en solution.

Paulesco (1904) s'intéresse aux métaux alcalino-terreux et à leur influence sur la levure de bière. Il appelle doses-limites les doses minima des sels des métaux alcalino-terreux, qui empêchent la production du gaz carbonique dans la fermentation alcoolique, et conclut qu'une molécule de métal alcalino-terreux agit comme deux molécules de métal alcalin.

Charrin, Henri et Monier-Vinard (1906) observent que dans l'action antiseptique de l'argent colloïdal sur le développement bactérien, les résultats dépendent de la préparation du métal.

Manoilow (1907) recherche la toxicité des sels de nickel sur les bactéries.

Enfin, Eisler (1909) montre que les sels bivalents sont beaucoup plus toxiques que les sels monovalents.

Action de quelques sels alcalins sur le Bacille pyocyanique

Péju et Rajat (1906) disent que le Bacille pyocyanique a été classé, par Fischer, dans la catégorie des bacilles facilement perméables.

Masson (1910) constate que le Bacille pyocyanique, qui a été bien étudié au point de vue chromogène, n'a pas été beaucoup expérimenté au point de vue de son action sur les sels.

Macé (1913) observe le développement facile du Bacille pyocyanique en bouillon phéniqué à 1 et même à 1,25 pour 1.000 à 42°, d'où son isolement possible, pour la recherche du Colibacille et des espèces similaires, dans les eaux principalement.

TRAVAUX PERSONNELS AVEC LA VARIÉTÉ ÉRYTHROGÈNE

En ce qui me concerne, et avant d'aborder les antiseptiques salins, j'ai tenu à me rendre compte de la façon dont se comportent, vis-à-vis du Bacille pyocyanique érythrogène, l'eau peptonée plus ou moins concentrée, l'eau distillée et l'eau de conduite.

Eau peptonée

J'ai appelé c une solution renfermant 2 % de peptone. J'ai constaté avec c/256, qu'il restait encore des germes vivants après quatre-vingts jours.

J'ai voulu posséder quelques notions sur la multiplication du Bacille pyocyanique érythrogène, sur eau peptonée normale à 2 %. La technique que j'ai employée pour la numération des microbes est celle de Godoy (1909), qui cultivait le bacille typhique en bouillon, et numérait les germes tous les quarts d'heure, en les passant sur bouillon gélosé. J'ai expérimenté avec une culture peptonée et après dilution aqueuse convenable du milieu de culture, j'ai passé les bacilles sur gélose peptonée, toutes les dix minutes.

Après l'ensemencement, pendant les quarante premières minutes, j'ai constaté tout d'abord une mort rapide et une diminution considérable du nombre des germes vivants. Après ce temps, j'ai trouvé six fois moins de germes qu'au moment de l'ensemencement. Mais la natalité est alors devenue supérieure à la mortalité et le nombre des germes a augmenté rapidement.

Eau distillée

Dans l'eau distillée, ensemencée avec du Bacille pyocyanique, j'ai retrouvé des germes vivants après quatre-vingts jours.

Eau distillée renfermant une faible dose de sel

Avec 0 gr. 50 p. 1.000 de chlorure de sodium, j'ai obtenu les mêmes résultats qu'avec l'eau distillée simple.

Eau de conduite

L'eau de conduite renfermait encore des cellules vivantes quarante-deux jours après l'ensemencement.

Conclusion. — Le Bacille pyocyanique érythrogène peut vivre pendant plusieurs mois dans un milieu non nutritif ou très faiblement nutritif.

Action antiseptique du chlorure de sodium

Eau distillée contenant des doses croissantes de sel

Une heure après l'ensemencement, l'eau distillée avec 16 % de sel, renferme encore des bacilles vivants. Au bout de vingt-quatre heures, la solution à 7 % n'a plus que des cellules mortes, alors que la solution à 6 % renferme encore des cellules vivantes. Après quarante-huit heures, une solution à 3 % est stérile.

Chlorure de sodium en solution peptonée

Dans une expérience préliminaire, le milieu ensemencé, contenant 5 % et moins de sel, renferme encore des germes vivants après cinquante-trois jours, tandis qu'avec 10 % et plus de sel, la mort survient rapidement. Je limite ainsi entre 5 et 10 % de chlorure de sodium, le champ des recherches ultérieures.

Dans une deuxième expérience, portant sur la peptone salée ensemencée, je constate qu'une solution peptonée à 6 % de sel, quarante jours après l'ensemencement, renferme des germes vivants. Une solution à 7 %, au bout de vingt-six jours, n'est pas stérile, mais au bout de vingt-neuf jours le devient. A 8 et 9 %, après vingt-quatre heures, il y a encore des germes vivants, mais, après quarante-huit heures, ils ont disparu.

Observation. — J'observe un développement microbien pour une culture à 6 %, et qui ne se révèle plus pour une concentration à 7 %.

Conclusion. — Le point osmotique ou concentration-limite de végétation est donc 6 %. La concentration à 7 %

tue seulement les germes à la longue; celle à 8 % est rapidement toxique.

D'après Miquel (1883, 1884), la dose infertilisante, c'est-à-dire celle qui ne donne pas de développement en milieu toxique après dix jours, est 7 %, et la dose toxique qui tue tous les germes en dix jours, est 8 %.

Pour vérifier les résultats précédents, je conduis ces mêmes expériences à plusieurs reprises.

A 6 %, j'observe toujours le développement.

A 7 %, après quatre jours, je constate, dans deux cas, que toutes les bactéries sont mortes, mais dans quatre cas, qu'elles ne le sont pas. Pour ces derniers, deux fois, le développement s'effectue en milieu toxique, deux autres il n'y a pas de développement, mais il y a encore des germes vivants après trente jours, sans multiplication apparente.

A 8 %, sur onze cas, j'obtiens une fois le développement dans le milieu salin lui-même, alors que dix fois, la mort survient dans des temps variables (de un à quatre jours et plus).

A 9 %, après quarante-huit heures, alors que dans un cas la mort se produit, après trois jours, dans un autre cas, il reste des germes vivants.

Enfin, même à 10 %, alors qu'après vingt-quatre heures, la vie persiste toujours, après soixante-douze heures, la mort frappe tous les bacilles.

On voit ainsi, d'après le peu de constance de ces observations, combien il est difficile de fixer la dose toxique limite, pour une substance et une espèce bactérienne déterminées.

Je dois dire que dans les expériences qui précèdent, le nombre des germes ensemencés varie pour chaque série et dans chaque cas, de sorte que je suis amené à pressentir l'importance qu'il faut attacher à la quantité de semence.

Dans les essais qui suivent, je NUMÈRE LA SEMENCE, la numération seule permettant de résoudre le problème avec exactitude.

Les germes ensemencés proviennent d'une culture en bouillon peptoné, âgée de vingt-quatre heures, de Bacille pyocyanique érythrogène. J'ensemence de la gélose peptonée en tube incliné; au bout de vingt-quatre heures, je prépare dans l'eau distillée une émulsion, que je centrifuge longuement. Je numère cette émulsion, en la diluant pour la rendre moins riche, et en ensemençant avec un volume bien déterminé de cette dilution, de la gélose peptonée en boîtes de PÉTRI. Au bout de quatre jours, la numération des colonies me permet de connaître le nombre de germes de l'émulsion mère, car pour la facilité de l'exposition, j'admets qu'une seule colonie sur gélose provient d'une seule et même cellule microbienne.

Ensuite, j'ensemence de l'eau peptonée neutralisée à 2 %, renfermant des quantités variables de chlorure de sodium. *Je me sers toujours d'une pipette graduée*, permettant seule de prendre des *quantités* nettement *déterminées d'émulsion microbienne*, le procédé de la spirale de platine étant d'une imprécision vraiment trop grande.

Enfin, je fais toujours des solutions aqueuses d'antiseptique, l'eau étant le dissolvant tout indiqué pour le chlorure de sodium. De plus, l'eau seule est le dissolvant idéal pour les antiseptiques, tout autre (un dissolvant

alcoolique, par exemple) étant susceptible de joindre ses propriétés bactéricides à celles de l'antiseptique considéré, ce qui fausse les résultats de l'expérience.

Le milieu antiseptique ensemencé est mis ensuite à l'étuve à 37°.

Deux cas sont à considérer : 1° le *développement;* 2° le *non développement en milieu antiseptique.*

Dans le second cas, par *passages* à intervalles réguliers de la culture sur eau peptonée neutralisée à 2 % (*milieu normal*), j'établis dans quelles conditions la culture antiseptique est *stérile ou non.* Au milieu normal, s'adjoint bien avec les germes morts ou vivants, une certaine quantité d'antiseptique, mais cette quantité extrêmement faible ne peut qu'agir favorablement sur la multiplication des germes vivants réensemencés.

Voici les résultats de l'étude de deux séries, qui varient par les concentrations salines et le nombre de germes :

Première série

J'examine les concentrations de 7, 8, 9 % de chlorure de sodium.

Je désigne par E, 10 cm^3 de peptone salée, représentant 45 millions de bacilles. Je prépare aussi les émulsions E/6, E/16, E/100, E/500.

Enfin, j'expérimente avec trois tubes pour chaque émulsion et pour chaque concentration saline.

1° *Développement dans le milieu salin*

Après quarante-huit heures de culture, un tube E à 7 % présente un trouble très net.

Après quatre-vingt-seize heures, un deuxième tube E à 7 % semble présenter un développement.

Après six jours, le tube précédent se caractérise par un trouble intense.

Après dix jours, le troisième tube E à 7 % montre une végétation. Il en est de même d'un tube E 6 à 7 % et de deux tubes E à 8 %.

2° *Non développement dans le milieu salin*

J'ai consigné les résultats obtenus dans un tableau, dont les signes + indiquent qu'il reste, en milieu salin, des germes vivants. Leur existence est révélée après 24, 48, 72, 96, 168 heures, par passages sur milieu normal qui se développe; les signes — indiquent que tous les germes sont morts.

Concent. saline...	7 p. 100				
Durée de l'action antiseptique...	24	48	72	96	168
ÉMULSIONS : E.....	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
E/6.....	+ + +	+ + +	+ + +	+ + —	+ — —
E/16...	+ + +	+ + +	+ + —	+ + —	+ — —
E/100...	+ — —	+ — —	+ — —	+ — —	— — —
E/500...	+ — —	— — —	— — —	— — —	— — —

Concent. saline...	8 p. 100				
Durée de l'action antiseptique...	24	48	72	96	168
ÉMULSIONS : E.....	+ + +	+ + +	+ + −	+ − −	+ − −
ÉMULSIONS : E/6.....	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ − −
ÉMULSIONS : E/16....	+ + +	+ + −	− − −	− − −	− − −
ÉMULSIONS : E/100...	+ + −	+ − −	+ − −	− − −	− − −
ÉMULSIONS : E/500...	+ − −	− − −	− − −	− − −	− − −

Concent. saline...	9 p. 100				
Durée de l'action antiseptique...	24	48	72	96	168
ÉMULSIONS : E.....	+ + +	+ − −	+ − −	− − −	− − −
ÉMULSIONS : E/6.....	+ − −	− − −	− − −	− − −	− − −
ÉMULSIONS : E/16....	− − −	− − −	− − −	− − −	− − −
ÉMULSIONS : E/100...	− − −	− − −	− − −	− − −	− − −
ÉMULSIONS : E/500...	− − −	− − −	− − −	− − −	− − −

Observation. — Le milieu normal se développe (signe +) vingt-quatre heures après qu'il a été réensemencé avec les germes prélevés en milieu toxique, sauf les *exceptions* suivantes, pour lesquelles le *développement* ne s'effectue qu'après *quarante-huit heures*.

Après 24 heures en milieu toxique....	2 tubes 8 p. 100.	E/16
	2 — .	E/100
	2 tubes 9 p. 100.	E
	1 tube 9 p. 100..	E/100
Après 48 heures en milieu toxique.....	1 tube 8 p. 100..	E
	2 tubes 8 p. 100.	E/16
	1 tube 9 p. 100..	E
Après 72 heures en milieu toxique....	1 tube 7 p. 100..	E/16
Après 96 heures en milieu toxique.....	1 tube 7 p. 100..	E/500

Conclusion. — La *dose infertilisante*, pour laquelle il n'y a pas de développement en milieu toxique après dix jours, correspond à une concentration saline de 8 % du milieu E/6 ou à une concentration saline de 7 % du milieu E/16.

La *dose toxique*, pour laquelle il n'y a plus de germes vivants après dix jours, correspond à une concentration saline de 8 % du milieu E/16 ou à une concentration saline de 7 % du milieu E/100.

Deuxième série

J'ai examiné les concentrations de 8, 9, 10 % de chlorure de sodium. E représente 10 cm³ de milieu cultural antiseptisé (eau peptonée + NaCl) avec 370 millions de germes. De même, j'ai préparé E/16, E/100, E/500. Un seul tube a été mis en expérience et le tableau ci-dessous indique en milieu toxique la persistance de la vitalité (signe +) et la mort (signe —).

Concentration saline.....		8 p. 100				
Durée de l'action antiseptique.		24	48	72	120	216
ÉMULSIONS ..	E.....	+	+	+	+	+
	E/16.....	+	+	+	+	+
	E/100....	+	—	—	—	—
	E/500....	+	—	—	—	—

Concentration saline.....		9 p. 100				
Durée de l'action antiseptique.....		24	48	72	120	216
ÉMULSIONS ..	E.....	+	+	+	+	—
	E/16.....	+	—	—	—	—
	E/100....	—	—	—	—	—
	E/500....	—	—	—	—	—

Concentration saline.....		10 p. 100				
Durée de l'action antiseptique.....		24	48	72	120	216
ÉMULSIONS ..	E..	+	+	+	—	—
	E/16.....	+	—	—	—	—
	E/100....	+	—	—	—	—
	E/500....	+	—	—	—	—

Conclusion. — La *dose toxique*, pour laquelle il n'y a plus de germes vivants après dix jours, correspond à une concentration saline de 8 % du milieu E/100.

Variation du nombre des cellules vivantes dans une culture en peptone salée

Le nombre des germes vivants dans une culture en peptone salée, varie de la façon suivante :

A 6 % de chlorure de sodium, à partir du cinquième jour, il y a toujours accroissement.

A 7 % de sel, le nombre des germes vivants diminue de façon intense pendant les quinze premières heures, particulièrement pendant la première demi-heure. A partir de la quinzième heure, il ne cesse de croître.

A 8 % de sel, dans un cas, il y a décroissance du nombre des cellules vivantes, jusqu'à la vingt-quatrième heure, et au bout de quatre jours, tous les germes sont morts. Dans un autre cas, où le nombre de germes était plus élevé, j'ai observé une diminution du nombre des germes vivants, jusqu'à la sixième heure seulement, et ensuite un accroissement.

Conclusions. — On se rend compte ainsi de *l'importance énorme* qu'occupent dans la détermination du *pouvoir antiseptique*, le *nombre de germes ensemencés* et le *temps de contact* de l'antiseptique et de la semence.

Pour une concentration saline de 6 %, on peut dire qu'il y a toujours développement dans la peptone salée, qui devient un véritable milieu de culture. Le développement à 7 % et même à 8 % de sel est subordonné à la

plus ou moins grande richesse de la semence. Enfin, à 9 %, je n'ai jamais constaté de développement.

Si l'on ne considère plus le développement, mais la survivance, il reste des germes vivants pendant plusieurs semaines, pour des taux de chlorure de sodium de 7 et même de 8 %, lorsqu'on a mis en expérience un nombre considérable de cellules. Enfin, à 9 et 10 %, je n'ai pas retrouvé de microbes vivants après trois à quatre jours.

La conclusion générale qui s'impose est alors la suivante :

Le point osmotique ou concentration-limite de végétation est, 6, 7 ou 8, variant en raison directe du nombre de germes ensemencés.

Action antiseptique de l'iodure de potassium en solution peptonée

Essai préliminaire

Si une semence pauvre est mise au contact d'une solution peptonée à 3 % d'iodure de potassium, tous les germes peuvent mourir en vingt-quatre heures. Lorsque, exceptionnellement, un développement se manifeste, il présente un retard de plusieurs jours et il est achromogène.

Pour une concentration de 4 % d'iodure de potassium et lorsqu'il y a peu de germes, mis en expérience, la mort est totale après quarante-huit heures.

Par contre, si la semence est très riche, pour un taux de 7 % d'iodure de potassium et après vingt-quatre heures, il peut rester des germes vivants.

Essai avec numération

J'ai examiné les concentrations de 3, 4 et 5 % d'iodure de potassium. J'ai préparé E, qui représente 370.800.000 germes dans 10 cm³ de milieu toxique. De plus, j'ai effectué les dilutions E/16, E/100, E/500.

Après quarante-huit heures, avec une solution d'iodure de potassium à 3 %, le développement s'effectue en milieu toxique pour E, E/16, E/100, E/500. Quant aux solutions à 4 et 5 %, elles donnent les résultats suivants :

I. — *Développement en milieu toxique*

Il s'effectue après quarante-huit heures : à 4 % pour E ; après six jours, à 4 %, pour E/16, et après dix jours, il n'y a pas de changement.

II. — *Non développement dans le milieu toxique*

La survivance et la mortalité sont consignées dans le tableau ci-dessous :

Concentration saline.....		4 p. 100				
Durée de l'action antiseptique.....		24	48	72	120	216
ÉMULSIONS..	E.....	+	+	+	+	+
	E/16.....	+	+	+	+	+
	E/100....	+	+	+	+	—
	E/500....	+	+	—	—	—

Concentration saline.....		5 p. 100				
Durée de l'action antiseptique.....		24	48	72	120	216
ÉMULSIONS..	E.....	+	+	+	+	—
	E/16.....	+	+	—	—	—
	E/100....	+	—	—	—	—
	E/500....	+	—	—	—	—

Observation. — Le milieu normal se développe (signe +) vingt-quatre heures après qu'il a été réensemencé avec les germes prélevés en milieu toxique, sauf les exceptions suivantes, pour lesquelles le développement ne s'effectue qu'après quarante-huit heures.

Après quarante-huit heures, en milieu toxique : E/500 à 4 % et E/16 à 5 %.

Après cent vingt heures en milieu toxique : E à 5 %.

CONCLUSION. — La *dose infertilisante* correspond à une concentration saline de 4 % et au milieu E/100, et la *dose toxique* correspond à une concentration saline de 5 % et au milieu E.

Notions sur l'action antiseptique en solution peptonée du chlorure de potassium, du sulfate de sodium et du sulfate de potassium

CHLORURE DE POTASSIUM

J'ai retrouvé des germes vivants, cinq jours après l'ensemencement d'eau peptonée, contenant 10 % de chlorure de potassium. Le développement en milieu toxique avait

lieu respectivement après vingt-quatre heures, quarante-huit heures et huit jours pour des concentrations de 7, 8, 9 % de sel.

Sulfate de sodium

J'ai retrouvé des bacilles vivants, cinq jours après les avoir mis au contact d'une solution peptonée de sulfate de sodium à 36 %.

Le développement en milieu toxique a lieu après vingt-quatre heures, pour un taux de 24 % de sel et après huit jours pour un taux de 26 %.

Sulfate de potassium

J'observe, après vingt-quatre heures, le développement d'une culture peptonée tenant en dissolution 12 % de sulfate de potassium.

Mon expérimentation a dû se borner là, à cause de l'insolubilité, à plus de 12 %, du sulfate de potassium dans l'eau peptonée.

Disparition de la chromogénèse

L'un des phénomènes les plus curieux qui accompagnent l'action antiseptique, et que j'ai déjà signalé précédemment, est la disparition de la chromogénèse, signe de ralentissement de la vitalité.

A ce sujet, Wasserzug (1887), se servant de bouillon de veau, additionné d'antiseptiques, signale les doses qui empêchent la production de la couleur (pyocyanine), avec le B. pyocyanique. Charrin et Roger (1887) disent que les antiseptiques retardent ou suppriment la chromogénèse, mais sans apporter de modifications profondes

aux fonctions microbiennes, car quelques gouttes prises dans la culture incolore et passées dans le bouillon pur, permettent de retrouver la chromogénèse.

Duclaux (1898) mentionne que les microbes peuvent, avec des doses un peu fortes d'acides, perdre la propriété de sécréter la matière colorante.

D'après Le Noir (1896), le Bacille pyocyanique ne donnerait pas de pigment en se développant dans l'urine normale, ce qui serait vraisemblablement dû aux antiseptiques renfermés dans la culture ?

Présence de pyocyanine dans les cultures sur eau peptonée renfermant des sels en dissolution

Chlorure de sodium

La pyocyanine apparaît pour une solution à 5 % de chlorure de sodium et non pour une solution à 6 %.

Iodure de potassium

En présence d'iodure de potassium à 4 %, il n'y a pas de sécrétion de pyocyanine, qui se révèle avec 3 % de sel, quand il y a suffisamment de microbes ensemencés. Avec une semence peu riche, on n'observe que de la fluorescence. Dans la chromogénèse, le nombre de germes est donc encore à envisager au même titre que le degré de concentration saline.

Chlorure de potassium

La présence de pyocyanine est constante dans une culture tenant en dissolution du chlorure de potassium à 3,5 %.

Sulfate de potassium

On décèle la pyocyanine dans une culture sur eau peptonée renfermant 8 % de sulfate de potassium.

CONCLUSIONS

Après avoir mentionné le grand nombre de facteurs sous la dépendance desquels se trouve la détermination du pouvoir antiseptique, j'ai constaté que le Bacille pyocyanique érythrogène *peut vivre plusieurs mois* dans un *milieu non nutritif* ou *très peu nutritif*.

Je me suis particulièrement donné pour tâche de fixer avec les sels alcalins :

1° *La dose limite de végétation* (*point osmotique*) ;

2° Le *temps* plus ou moins long que mettent les *germes* a *mourir* dans une culture non développée.

De ces expériences s'est dégagée *l'importance de la quantité de semence*. Celle-ci, jouant un rôle dans l'intensité de la végétation, influe également sur la *disparition* de la *pyocyanine*.

CHAPITRE VI

SÉROLOGIE

L'importance des réactions sérologiques dans l'identification des espèces bactériennes est assez connue pour que je sois dispensé d'entrer dans de longues considérations en abordant l'étude des réactions d'immunité avec le Bacille pyocyanique.

LASSEUR, qui étudie d'une façon systématique ces réactions avec un grand nombre de bactéries, a bien voulu mettre gracieusement à ma disposition les immunsérums d'un Bacille pyocyanique de variété *pyocyanogène :* PY, des *deux germes érythrogènes :* G et L de GESSARD et de LASSEUR (celui-ci avec deux races, A et F), et du type *érythrogène au minimum* : EM, sélectionné à partir de L.

Dans le tableau ci-dessous sont consignés les résultats relatifs à l'agglutination. Quant à la déviation du complément, je résumerai les conclusions inédites de LASSEUR.

I. — Agglutination

DÉSIGNATION des anti-sérums	DÉSIGNATION des antigènes	RÉSULTATS de l'agglutination après séjour de 4 heures à 37°
Sérum anti-L	L . . Race A	+
	L . . Race F	+
	L . . Em.	+
	G	0
	Py	+
Sérum anti-G	L . . Race A	0
	L . . Race F	0
	G	+
	Py	0
Sérum anti-Py	L . . Race A	+
	L . . Race F	+
	G	0
	Py	+

II. — Fixation de l'Alexine ou « Déviation du complément » des Auteurs

En première approximation, les races A et F en présence de sérum anti-L, fixent à peu près la même quantité d'alexine que l'antigène L. L'étude plus approfondie du phénomène montre que F fixe une plus grande quantité de sensibilisatrice et par suite d'alexine que A : c'est d'ailleurs ce que l'on observe aussi dans la fixation de l'agglutinine.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les conclusions sont exposées dans la communication suivante faite à la Société de Biologie, le 7 décembre 1918, par M. GRIMBERT, sous le titre : « Observations sur un nouvel échantillon du *Bacillus pyocyaneus erythrogenes* C. GESSARD ».

« J'ai étudié un Bacille pyocyanique (isolé par LASSEUR, du pus d'une adénite). Le Bacille présente les caractères de la *variété érythrogène*, et donne, en particulier, des cultures rouge vif sur eau peptonée (1); on sait que, sur ce milieu, les variétés *pyocyanogène* et *mélanogène* se distinguent l'une de l'autre par la couleur bleue de la première (pyocyanine) et la couleur noire de la seconde (mélanine) .

GESSARD, auquel j'exprime toute ma gratitude pour son amabilité à mon égard, a confirmé ma détermination et m'a remis un échantillon de son microbe érythrogène (soit G) pour le comparer avec celui de Lasseur (soit L), et avec un germe pyocyanogène normal (soit PY).

(1) Toutes les cultures se sont développées à la température de 37°.

Je n'ai observé que des différences légères et d'ordre contingent entre G et L, cultivés sur pomme de terre, lait, bouillon, blanc d'œuf. Les pigments sont plus ou moins précoces dans leur apparition et n'atteignent pas toujours des intensités de production rigoureusement égales.

G et L se comportent de façon à peu près identique, en milieux peptonés, où la présence du pigment rouge se manifeste si nettement. L'eau peptonée, qui commence à rougir au cinquième ou au sixième jour, perd partiellement sa coloration au bout de plusieurs mois. La gélose peptone-glycérinée rosit souvent au bout de vingt-quatre heures et toujours au bout de quarante-huit heures; des passages successifs sur ce milieu atténuent rapidement la production du chromogène rouge. Le rougissement, qui est d'autant plus rapide et d'autant plus accentué que la surface d'oxydation est plus grande, ne se manifeste pas dans le vide.

La coloration jaune-verdâtre des cultures de G et L, sur eau peptonée, âgées de quatre jours, est voisine de la coloration d'une culture de PY, faite dans les mêmes conditions.

Par traitement de ces cultures de G, L, PY à l'eau oxygénée, G et L deviennent rouge violacé, PY, bleu violacé. En faisant agir ensuite l'ammoniaque et le chloroforme, on constate que L donne davantage de chromogène rouge et de pyocyanine que G.

G et L possèdent beaucoup plus de chromogène rouge, mais moins de pyocyanine que PY.

Wasserzug et Lasseur, entre autres, ont montré l'existence de types différents de cellules, dans des cultures

de bacilles chromogènes. J'ai aussi pu *sélectionner deux types* de microbes :

Le *premier* est un dérivé de L qui ne rougit plus les solutions de peptone.

Pour l'obtenir, j'ai effectué, pendant *six mois*, *dix* passages sur eau peptonée, suivis d'autres sur gélose peptonée en plaques, en sélectionnant chaque fois les tubes et colonies *les moins érythrogènes*. Le corps rouge n'a pas disparu totalement, mais il est en si faible quantité (il y en a moins que chez PY), que l'eau oxygénée est indispensable pour le faire apparaître. La pyocyanine aussi n'existe plus qu'à l'état de traces, la fluorescence demeurant intense.

Le *deuxième* a été obtenu en sélectionnant les tubes et colonies *les plus érythrogènes*. J'ai ainsi accentué de façon appréciable la production du pigment rouge et de la pyocyanine, celle-ci étant néanmoins demeurée inférieure en quantité à ce qu'elle est chez PY.

Dans les sélections des deux types, j'ai constaté que si des quantités de pyocyanine et de corps rouge varient parallèlement, la fluorescence est peu influencée.

GESSARD a décrit *deux races* : A et F de son B. pyocyanique var. érythrogène :

1° *La race A*, en bouillon, donne de la pyocyanine et de la fluorescence;

2° *La race F*, qui, dans les mêmes conditions, ne produit que de la fluorescence.

J'ai obtenu de même les races A et F de L, correspondantes aux races A et F de G; la race A se différencie

surtout de la race F par une plus grande abondance de corps colorés.

Une culture sur eau peptonée, renfermant le chromogène rouge, après élimination de la pyocyanine, est très fluorescente. Un excès d'ammoniaque la fait passer au rose jaunâtre. Si on neutralise par l'acide acétique, et qu'on en ajoute un léger excès, on obtient une coloration rouge carmin.

Au point de vue spectroscopique, une culture rouge, débarrassée au préalable de toute pyocyanine, montre que le corps rouge présente une absorption continue, un peu plus marquée dans la région violette du spectre, sans atteindre toutefois la valeur d'une bande véritable.

En résumé, le second échantillon de la variété érythrogène du Bacille pyocyanique, diffère peu du premier, étudié par GESSARD. Il s'en distingue surtout par les temps d'apparition des pigments, et leur intensité de coloration, que l'eau oxygénée met bien en évidence.

Comme le premier, il peut perdre la propriété de sécréter de la pyocyanine, et il donne par sélection, deux types microbiens aux pouvoirs érythrogènes distincts. »

J'ajoute que la glycérine exalte considérablement la sécrétion de la pyocyanine sur eau peptonée.

D'autre part, les germes érythrogènes s'étant développés sur eau peptonée salée, à la concentration-limite de végétation, sont capables, quand ils sont réensemencés sur eau peptonée normale, de produire une quantité plus abondante de corps rouge.

Enfin, parmi les facteurs dont la variation permet de déterminer le pouvoir antiseptique des sels vis-à-vis du

Bacille pyocyanique érythrogène, j'ai montré l'importance du temps de contact entre l'antiseptique et la bactérie et l'influence du nombre de microbes ensemencés.

Vu :

Nancy, le 5 Mai 1919.

Le Directeur de l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Nancy,

L. BRUNTZ.

Vu et permis d'imprimer,

Nancy, le 8 Mai 1919.

Le Recteur de l'Académie :

Ch. ADAM,

Membre de l'Institut

APPENDICE

Au moment où l'impression de cette thèse est sur le point d'être terminée, je prends connaissance du Mémoire de GESSARD : « Diagnose pigmentaire du Bacille pyocyanique » (*Ann. I. P.*, Avril 1919, T. XXXIII, p. 241-261).

L'auteur expose la classification des variétés et des races de l'espèce pyocyanique. Il rapproche notamment les variétés pyocyanogène et érythrogène, aux différences quantitatives, variétés entre lesquelles existent des « types intermédiaires », sécrétant les pigments bleu et rouge, en plus ou moins grande abondance.

GESSARD classe le microbe que j'ai étudié parmi ces types intermédiaires, en disant qu'il est « un représentant de la variété érythrogène, dont la fonction caractéristique est contrebalancée par la fonction pyocyanogène ».

Comparant son germe érythrogène au mien, il conclut, comme moi, que mon germe, plus pyocyanogène que le sien, est moins précoce et moins rapide dans la sécrétion du pigment rouge.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1862. — Lücke. *Archiv. für klinische Chirurgie, Langenbeck*, Bd 115, cité par Gessard (1882).
1869. — Fordos. Recherches sur la matière colorante des suppurations bleues : Pyocyanine (*C. R. Ac. des Sc.*, t. LI, p. 215).
1870. — Raulin. Études chimiques sur la végétation (*Ann. des Sc. Nat.*, cité par Kossiakoff (1887).
1872. — Schroeter. *Beitræge*, Bd 1, Heft II, p. 122, cité par Gessard (1882).
1873. — Eberth. *Med. Centralblatt*, et
1875. — Eberth. *Archiv. für path. anat. und physiol. Virchow*, Bd LXII, cités par Gessard (1882).
1875. — Buchholtz. Antiseptica und Bakterien (*Archiv. für experim. Pathol. und Pharm.*, Bd 4, p. 1).
1876. — Pasteur. Études sur la bière (Gauthier-Villars, Paris, p. 287).
1876. — A. Fitz. *Bericht d. deutsche chem. Gesellschaft*, t. IX, p. 1348-1352.
1877. — — — — — — t. X, p. 276.
1878. — — — — — — t. XI, p. 1890.
1880. — — — — — — t. XIII, p. 1309.
1882. — — — — — — t. XV, p. 867.
1881. — Jalan de la Croix. Das Verhalten der Bakterien des Fleischwassers gegen einige Antiseptica (*Arch. f. experim. Pathol*, t. XIII, p. 175).
1882. — Gessard. De la pyocyanine et de son microbe (*Collect. thèses Facult. méd. Paris*, t. IX, n° 248).
1883. — Duclaux. *Microbiologie*, p. 818, cité par Kossiakoff (1887).
1883. — Miquel. Antiseptiques et bactéries (*Semaine médicale*, p. 222).
1883. — Miquel. *Annuaire de l'Observatoire de Montsouris*, p. 429.
1884. — — — — — p 561.
1887. — Ernst. Ueber einen neuen Bacillus des blauen Eiters (*Bacillus pyocyaneus β*), eine Spielart des B. p. der Autoren (*Zeitsch. f. Hyg.*, t. I, p. 369.

1887. — Charrin et Roger. Des modifications qu'on peut provoquer dans les fonctions d'un microbe chromogène (*C. R. Soc. Biol.*, t. IV, p. 596).
1887. — Wasserzug. Sur la formation de la matière colorante chez le B. pyocyanique (*Ann. I. P.*, t. I, p. 581-591).
1887. — Kossiakoff. De la propriété que possèdent les microbes de s'accommoder aux milieux antiseptiques (*Ann. I. P.*, t. I, p. 465).
1888. — Wasserzug. Variations durables de la forme et de la fonction chez les Bactéries (*Ann. I. P.*, t. II, p. 154).
1888. — Behring. *Centralblatt f. Bakt.*, t. III, p. 27
1888. — Yersin. Action de quelques antiseptiques et de la chaleur sur le bacille de la tuberculose (*Ann. I. Past.*, t. II, p. 60).
1889. — Charrin. Évolution des microbes chez les animaux vaccinés (*C. R. S. de Biol.*, t. I, p. 627).
1889. — Ruczicka. Experimentelle Studien über die Variabilitæt wichtiger Charakter des *Bacillus pyocyaneus* und des *Bacillus f. liquefaciens* (*Centr. f. Bak.*, t, XXIV, p. 11).
1889. — Babes. Notes sur quelques matières colorantes et aromatiques. produites par le Bacille pyocyanique (*C. R. Soc. Biol.*, t. I, p. 438).
1890. — Gessard. Nouvelles recherches sur le microbe pyocyanique (*Ann. I. P.*, t. IV, p. 88-103).
1891. — Gessard. Des races du Bacille pyocyanique (*Ann. I. P.*, t. V, p. 65-79).
1891. — Perdrix. Sur les fermentations produites par un microbe anaérobie de l'eau (*Ann. I. P.*, t. V, p. 287).
1891. — Miquel. *Manuel d'analyse bactériologique* (Édition 1891, p. 105).
1892. — Gessard. Sur la fonction fluorescigène des microbes (*Ann. I. P.*, t. VI, p. 801).
1892. — De Christmas. Sur quelques mélanges antiseptiques et leur valeur microbienne (*Ann. I. P.*, t. VI, p. 274).
1893. — Freudenreich. Sur une variété particulièrement chromogène du *B. pyocyaneus* (*Ann. de Micro*, t. V, p. 183).
1893. — Grimbert. Fermentation anaérobie produite par le *B. orthobutylicus* (*Ann. I. P.*, t. VII, p. 353).
1894. — Havermann. Ueber das Wachstum von Mikroorganismen bei Eisschrank temperatur (*Thèse de Rostock*, citée par Macé (1913).
1895. — Lepierre. Étude d'un Bacille fluorescent pathogène. Recherches sur la fonction fluorescigène des microbes (*Ann. I. P.*, t. IX, p. 643).
1895. — Schürmayer. Beitræge zur. Beurtheilung der Bedeutung und des Verhaltens des *Bacillus pyocyaneus* (*Zeitschrift für Hyg.*, t. XX, p. 281).
1896. — Cathelineau. Contribution à l'étude de *B. viridis*, de Lesage (*Ann. I. P.*, t. X, p. 228).
1896. — Kahlenberg et True. *The botanical gazette*, t. XXII, p. 81.
1896. — Paul et Krœnig. *Zeit f. physical ch.*, t. XXI, p. 414.
1896. — Le Noir. Infection urinaire mixte. Présence du B. pyocyanique dans l'urine de l'homme (*La Médecine nouvelle*, p. 569).
1898. — Radais. Sur une nouvelle race du B. pyocyanique (*C. R. Soc. Biol.*, 24 juillet).

1898. — Gessard. Sur une propriété nouvelle du B. pyocyanique (*C. R. Soc. Biol.*, t. V., p. 1033).

1898. — Duclaux. *Traité de Microbiologie* (Paris. Masson, t. I, *Microbiologie générale*, p. 225-236, 238-248, 273).

1898. — Maillard. Du rôle de l'ionisation dans les phénomènes vitaux (*C. R. Soc. Biol.*, t. L, p. 1210).

1898. — Loeb. Physiologische Untersuchungen über Ionenwirkungen (*Archiv. für die ges. Physiol.*, t. LXIX, p. 1).

1899. — Gheorghiewsky. Du mécanisme de l'immunité vis-à-vis du B. pyocyanique (*Ann. I. P.*, t. XIII, p. 298).

1899. — Jordan. *Bacillus pyocyaneus* and its pigments (*Journ. of exper. med.*, p. 633).

1899. — Boland. Ueber Pyocyanin, den blauen Farbstoff des *Bacillus pyocyaneus* (*Centr. f. Bakt.*, t. XXV, p. 897).

1899. — Bonjean. Le Bacille pyocyanique dans les eaux d'alimentation (*Ann. d'hyg. publ.*, t. XLII. p. 28).

1899. — Stadler. Ueber die Einwirkung von Kochsalz auf Bakterien, die bei den sogenannten Fleischvergiftungen eine Rolle spielen (*Arch. f. Hyg.*, B. 35, p. 40-82).

1900. — Legros. Action des pigments microbiens (*C. R. S. Biol.*, t. XLV, p. 900).

1900. — Krause. Beiträge zur Kenntniss des *Bacillus pyocyaneus* (*Cent. f. Bakt.*, t. XXVII, p. 769).

1900. — Kuntz. Ein Beitrag zur Kenntniss der Bedingungen der Farbstoffbildung des *B. prodigiosus* (*Zeit. f. Hyg.*, Bd 34, p. 169).

1901. — Jirou. Sur les bacilles fluorescents et le B. pyocyanique (*Journ. de Physiol.*, t. III, p. 188).

1901. — Gessard. Étude sur la tyrosinase (*Ann. I. P.*, t. XV, p. 592).

1901. — Gessard. Variété mélanogène du B. pyocyanique (*Ann. I. P.*, t. XV, p. 817).

1902. — Gessard. Essai sur la biologie du B. pyocyanique (*Ann. I. P.*, t. XVI, p. 313).

1902. — Aloy et Bardier. Action physiologique des métaux alcalino-terreux et du magnésium sur la marche de la fermentation lactique (*C. R. Soc. Biol.*, t. LIV, p. 848.

1903. — Samkow. Zur Physiologie des *B. prodigiosus* (*C. f. Bakt.*, II Abt. Bd. XI, p. 305).

1904. — Gilbert et Carnot. Action de NaCl sur le Pneumocbque et l'infection pneumococcique. Signification de la rétention des chlorures (*C. R. Soc. Biol.*, t. LVI, p. 925).

1904. — Paulesco. Actions des sels des métaux alcalins sur la substance vivante (*C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXXVIII, p. 1728).

1904. — Paulesco. Actions des sels des métaux alcalino-terreux sur la substance vivante (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXXXIX, p. 158).

1905. — Sullivan. Synthetic culture media and the biochemistry of bacterial pigments (*Journ. of medic. research.*, t. XIV, n° 1, p. 109-160).

1905. — Lafforgue. Action favorisante de NaCl, en solution hypertonique, sur le pouvoir pathogène des saprophytes (*C. R. Soc. Biol.*, t. LVII, p. 968).

1906. — Charrin, Henri et Monier-Vinard. Action des solutions d'argent colloïdal sur le Bacille pyocyanique (*C. R. Soc. Biol.*, t. LVIII, p. 120-121).

1906. — Peju et Rajat. Vue d'ensemble sur l'action de l'iodure de potassium, facteur de polymorphisme chez les Bactéries (*C. R. Soc. Biol.*, t. LVIII, p. 225).

1907. — Mazzei. Sul comportamento di alcuni-batteri cromogeni della acque in culture glicerinate (*Riv. d'Ig. e San Pubbl.*, p. 356-365).

1907. — Javillier. Sur l'influence favorable de très petites doses de zinc, sur la végétation de *Sterigmatocystis nigra* V. Tgh (*C. R. Ac. Sc.*, t. CXLV, p. 1212).

1907. — Manoilow. Ueber die Wirkung der Nickelsalze auf Mikroorganismen (*C. f. Bakt.*, II, t. XVIII, p. 199-211).

1908. — Gianlucco. Sullo sviluppo dei batteri en terreni di coltura continente alogeni (*Ann. d'Ig. Sperim.*, t. XVIII, p. 255-266).

1908. — Gueguen. Sur une méthode précise de détermination des pouvoirs antiseptiques (*C. R. Soc. Biol.*, t. XIV, p. 364).

1908. — Guillemard. Utilisation des solutions salines à la différenciation des Bactériacées. Séparation de *B. typhosus* de *B. Coli* (*C. R. Ac. des Sc.*, t. 146, p. 1177).

1909. — Trillat et Sauton. Action des gaz putrides sur les microbes. Cas de la levure (*C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLIX, p. 875).

1909. — Levi D. Vida. Vitalita dei germi patogeni in alcune soluzioni saline e in alcune acque potabili e minerali (*Ann. Ig. Sper.*, t. XIX, f. 3, p. 251-264).

1909. — Eisler. Ueber Wirkungen von Salzen auf Bakterien (*Centr. f. Bakt.*, I Abt., Bd 51, p. 546-563).

1909. — Guillemard. Diversité des résistances des Bactéries à la pression osmotique (*C. R. Soc. Biol.*, t. II, p. 538).

1909. — Godoy. Ueber die Vermehrung der Bakterien in den Kulturen (*Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, t. I, p. 87-98).

1910. — Delepine. — Contribution to the study of chemical disinfectants (*Journal of the Society of chem. Industry*, n° 23, t. XXIX, 15 déc. 1910).

1910. — Masson. Essai sur l'adaptation des Bactéries aux antiseptiques (*Thèse Pharm.*, Paris, 1910, 94 pages, p. 21 et 82).

1910. — Dubois. Utilisation des solutions salines concentrées à la différenciation des Bactéries (*C. R. Soc Biol.*, t. LXVIII, p. 26-27).

1910. — Guillemard. Action comparée à l'égard des Bactéries, des solutions salines, relativement à leur degré de dissociation (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXIX, p. 141).

1910. — Muller. Ueber die Behinderung der Faülnis in Organen durch Kochsalz und die Einwirkung von Kochsalz auf die Vitalitæt pathogener Bakterien in tierischen Geweben (*Zeit. f. Infekt. und Hyg. der Haustiere*, f. 1-2, p. 30-53).

1910-1911. — Loëb et Wasteneys. *Bioch. Zeitschrift.* 1910, t. XXVI, p. 279-289 ; XXVII, p. 304 ; XXVIII, p. 176, 340, 350 ; XXIX, p. 80, 414. — 1911, t. XXXI, p. 450 ; XXXII, p. 155-308 ; XXXIII, p. 450, 489 ; XXXVI, p. 275.

1911. — Massi. Potere cromogeno di alcuni germi in brodo can glucosidi e in brodo consali biliari (*Riv. di Ig. e di San pubbl.*, t. XXII, p. 681).

1911. — Lasseur. Contribution à l'étude de B. chlororaphis (*Thèse Doct. ès-sc.*, Nancy, Berger-Levrault, p. 49-56, 60-62, 92-97, 103-105).

1911. — Hailer. Versuche über die entwicklungshemmenden und keimtœtenden Eigenschaften der freien schwefligen Sæure, der schwefligsauren Salze und einiger komplexer Verbindungen der schwefligen Sæure (*Arb. a. d. kaiserl. Gesundheit*, t. XXXVI, p. 297-340).

1912. — A. Frouin et Mlle Ledebt. Action du vanadate de soude et des terres rares sur le développement du B. pyocyanique, et la production de ses pigments (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXXII, p. 987).

1912. — Sperlich. Ueber Salztoleranz bezw. Halophilie von Bakterien der Luft, der Erde und Wassers (*C. f. Bakt.*, t. XXXIV, n° 14-17, 20 juillet).

1912. — Kiesel. Sur l'action de divers sels acides sur le développement de l'*Aspergillus niger* (*C. R. Ac. des Sc.*, t. CLV, p. 193).

1912. — Karaffa-Korbutt. Zur Frage des Einflusses des Kochsalzes auf die Lebenstætigkeit der Mikroorganismen (*Z. f. Hyg.*, t. LXXI, f. 1., p. 161).

1913. — Lasseur. Observations sur le pouvoir chromogène de quelques Bactéries (*Recueil publié à l'occasion du Jubilé scientifique du professeur* Le Monnier, Berger-Levrault, p. 99).

1913. — Macé. *Traité de Bactériologie.* 6e édition, p. 333, 334, 337.

1915. — Coupin. Résistance à la salure des bactéries marines (*C. R. Ac. des Sc.*, t. CLX, p. 443).

1917. — Tissier. Recherches sur la flore bactérienne des plaies de guerre (*Ann. I. P.*, 2e mémoire, t. XXXI, n° 4, p. 164, 165, avril).

1917. — Gessard. Variété érythrogène du Bacille pyocyanique (*C. R. Ac. des Sc.*, t. CLXV, p. 1071).

1918. — Mamelle. Observations sur un nouvel échantillon du *Bacillus pyocyaneus erythrogenes Gessard* (*C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXI, p. 1137).

1919. — Gessard. Diagnose pigmentaire du Bacille pyocyanique (*Ann. I. P.*, avril, n° 4, t. XXXIII, p. 241-261).

TABLE DES MATIÈRES

Pages

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION. 3

ÉTUDE HISTORIQUE 6

CHAPITRE PREMIER

Originalité de la variété érythrogène 17

CHAPITRE II

Caractères généraux de la variété érythrogène 29

CHAPITRE III

Propriétés de la semence 46

Types érythrogènes par sélection 52

CHAPITRE IV

Races A et F de la variété érythrogène, obtenues avec l'échantillon de LASSEUR. 55

CHAPITRE V

Généralités sur les antiseptiques. 67

Travaux personnels avec la variété érythrogène 80

CHAPITRE VI

Sérologie 97

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 99

APPENDICE. 104

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE. 105